DIE NA^+, K^+-ATPASE DES ERYTHROZYTEN ALS REZEPTOR FÜR PALYTOXIN: STUDIEN MITTELS RADIOLIGANDEN-BINDUNG UND ENZYMHEMMUNG

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Heiner Böttinger
aus Backnang

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546526_0008

DIE NA^+, K^+-ATPASE DES ERYTHROZYTEN ALS REZEPTOR FÜR PALYTOXIN: STUDIEN MITTELS RADIOLIGANDEN-BINDUNG UND ENZYMHEMMUNG

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Heiner Böttinger
aus Backnang

1985

Tag der mündlichen Prüfung :	10. Dezember 1985
Dekan :	Prof. Dr. K.-A. Kovar
1. Berichterstatter :	Prof. Dr. E. Habermann
2. Berichterstatter :	Prof. Dr. U. Weber

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. Habermann am Rudolf Buchheim-Institut für Pharmakologie der Universität Gießen durchgeführt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Habermann für die Überlassung des Themas, für anregende Diskussionen und seine stete Förderung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. U. Weber danke ich recht herzlich für die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen.

I N H A L T

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Struktur und biologische Wirkungen von Palytoxin	1
1.2.	Aufgabenstellung	5
2.	Abkürzungen	6
3.	Methoden und Substanzen	7
3.1.	Häufig verwendete Lösungen	7
3.2.	Palytoxin und Derivate	8
3.2.1.	Natives Palytoxin	8
3.2.2.	Darstellung von Palytoxin-Derivaten	8
3.2.2.1.	Markierung mit Dansylchlorid	8
3.2.2.2.	N-Acetylierung von Palytoxin	9
3.2.2.3.	Radioaktive Markierung mit ^{125}Iod	9
3.2.2.4.	Affinitätsreinigung der Iodierungsprodukte	11
3.3.	Charakterisierung der Palytoxin-Derivate	12
3.3.1.	Dünnschicht-Chromatographie	12
3.3.2.	Bestimmung des Kaliumaustritts aus Erythrozyten	13
3.3.3.	Bestimmung der spezifischen Aktivität des Tracers	14
3.3.3.1.	Ermittlung von Konzentrationen und spezifischer Radioaktivität des Tracers mittels "self-displacement"	15
3.3.3.2.	Ermittlung von Konzentrationen und spezifischer Radioaktivität des Tracers mittels Kaliumaustritt aus Erythrozyten	16

3.4.	Gewinnung von Erythrozyten und Membranen	16
3.4.1.	Darstellung intakter Erythrozyten	16
3.4.2.	ATP-Verarmung (Depletion) von Erythrozyten	17
3.4.3.	Darstellung von Erythrozytenmembranen nach Dodge et al. (1963)	17
3.4.4.	Darstellung von inside-out Vesikeln nach Lew et al. (1982)	18
3.4.5.	Darstellung von Nierenmembranen	19
3.4.6.	Präparation sonstiger Membranen	20
3.5.	Bindungsversuche	21
3.5.1.	Bindung von ^{125}I-Palytoxin	21
3.5.1.1.	Bindung an intakte Erythrozyten und deren Membranen	21
3.5.1.2.	Bindung an andere Membranen	22
3.5.2.	Bindungsversuche mit ^{3}H-Ouabain	23
3.5.2.1.	Bindung an Erythrozyten und deren Membranen	23
3.5.2.2.	Bindung an Nierenmembranen	23
3.5.3.	Auswertung der Bindungsversuche	24
3.5.3.1.	Sättigungsanalyse	24
3.5.3.2.	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante	25
3.5.3.3.	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante	26
3.5.3.4.	Hemmkonstanten	27
3.6.	Bestimmung der Aktivität der Na^+,K^+-ATPase	27
3.6.1.	Aktivierung der Nierenmembranen	28
3.6.2.	Bestimmung der enzymatischen Aktivität	28
3.7.	Bestimmung des Rubidiumefflux aus Vesikeln	29
4.	Ergebnisse	31
4.1.	Derivatisierungen	31

4.1.1. Derivatisierung der freien Aminogruppe 31

4.1.2. Iodmarkierung von Palytoxin 34

4.1.2.1. Säulenchromatographische Reinigung des iodierten Palytoxins 35

4.1.2.2. Affinitätsreinigung von ^{125}I-Palytoxin durch Bindung an Nierenmembranen 39

4.1.2.3. Bestimmung der spezifischen Radioaktivität 41

4.1.2.4. Vergleich von Bindung und Wirkung 45

4.2. Bindungscharakteristika am Erythrozyten 47

4.2.1. Zeitabhängigkeit der Bindung am Erythrozyten 47

4.2.2. Temperaturabhängigkeit der Bindung am Erythrozyten 49

4.2.3. pH-Abhängigkeit der Bindung am Erythrozyten 50

4.2.4. Einfluß der Erythrozytenkonzentration auf die Bindung von ^{125}I-Palytoxin 51

4.2.5. Untersuchungen zur Spezifität der Bindung 53

4.2.5.1. Bindungshemmung durch natives Palytoxin und Sättigbarkeit der Bindung 53

4.2.5.2. Reversibilität der ^{125}I-Palytoxin-Bindung 56

4.2.5.3. Untersuchungen zur Affinität von Palytoxin-Derivaten 59

4.2.6. Einfluß von Borat, Erdalkali- und Kaliumionen 60

4.3. Bindung an Membranen 63

4.3.1. Bindung an Erythrozytenmembranen 63

4.3.2. Bindung an Nierenmembranen 65

4.3.3. Bindung an Membranen aus verschiedenen Geweben 67

4.4. Beziehungen zur Na^+,K^+-ATPase 69

4.4.1. Einfluß von Cardenoliden auf den Palytoxin-bedingten Kaliumaustritt 69

4.4.2. Hemmung der ^{125}I-Palytoxin-Bindung durch Cardenolide 72

4.4.3. Kompetition zwischen Palytoxin und ^{3}H-Ouabain 75

4.4.4.	Bindung an ATP-verarmte Erythrozyten	77
4.4.5.	Einfluß von Nukleotiden auf die Bindung von ^{125}I-Palytoxin und ^{3}H-Ouabain an Erythrozytenmembranen	78
4.4.6.	^{125}I-Palytoxin und der Hundeerythrozyt	82
4.4.7.	Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch Palytoxin	85
4.5.	Rubidiumefflux aus Vesikeln	87
4.5.1.	Zeitabhängiger Efflux von ^{86}Rubidium	88
4.5.2.	Einfluß verschiedener Substanzen auf den Efflux	90
4.5.3.	Einfluß von Kalium auf den Palytoxin-bedingten Rubidiumefflux aus ROV	91
5.	Diskussion	93
5.1.	Iodierung von Palytoxin	93
5.2.	Biologische Aktivität der Palytoxin-Derivate	97
5.3.	Bindungsverhalten am Erythrozyten	98
5.4.	Palytoxin und Ouabain im Vergleich	100
5.5.	Die Na^+,K^+-ATPase als Rezeptor für Palytoxin	103
6.	Zusammenfassung	109
7.	Literatur	112

1. EINLEITUNG

1.1. STRUKTUR UND BIOLOGISCHE WIRKUNGEN VON PALYTOXIN

Palytoxin ist das wirksamste der tierischen Toxine. Es wurde aus Korallen verschiedener PALYTHOA Spezies isoliert und charakterisiert. Die erste Beschreibung und der Name stammt von Scheuer (1964) bzw. Moore und Scheuer (1971), die PTX aus P. toxica gewannen. Etwa zur gleichen Zeit wurde von Kimura und Hashimoto (1973) sowie von Attaway und Ciereszko (1974) das Toxin aus anderen Subspezies gereinigt.

Die Strukturaufklärung war sehr schwierig, da PTX keine Aminosäuren, Zuckerreste oder Fettsäuren enthält, die gewöhnlich in natürlich vorkommenden Biomolekülen gefunden werden. Zwei verschiedene Wege wurden beschritten. Nach partiellem Abbau von PTX und Trennung der entstandenen Spaltprodukte ermittelten Moore und Bartolini (1981) über NMR-Studien, sowie Uemura et al. (1981) über eine Resynthese der Spaltprodukte die Gesamtstruktur des Moleküles. Die endgültige Charakterisierung der Stereochemie erfolgte schließlich 1982 (Moore et al.; Cha et al.; Kishi). Die Struktur von PTX ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

PTX, $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$,(Molekulargewicht 2 680; Macfarlane et al., 1980) besteht aus drei Bausteinen, die peptidartig miteinander verknüpft sind. Das Molekül beginnt nit einer ungewöhnlich großen (Molekulargewicht 2 578) ω-Aminosäure,

die mit zahlreichen Hydroxylgruppen substituiert ist.

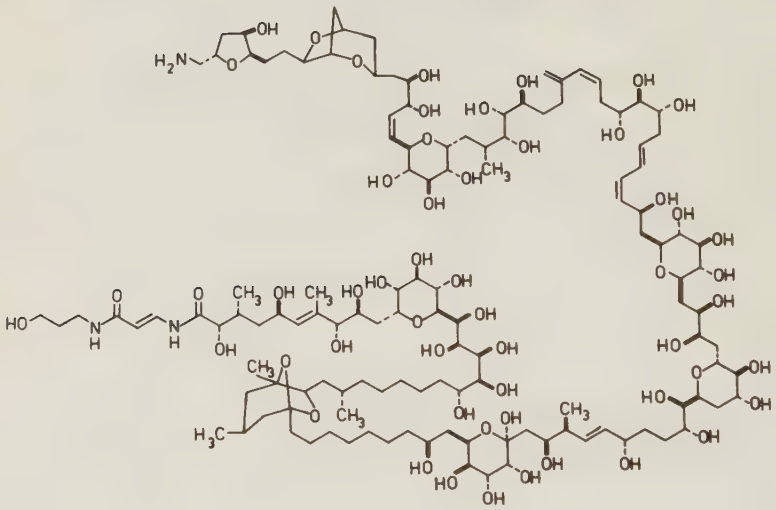

Abb. 1 Struktur von Palytoxin

Ihr folgt β-Dehydroalanin, das C-terminal mit Aminopropanol verbunden ist (Abbildung 1). Das gesamte Molekül besitzt 64 Asymmetriezentren und 7 Doppelbindungen, die jeweils geometrische Isomerie erlauben. Die Basizität des Moleküls beruht auf seiner freien Aminogruppe (Moore et al. 1980). Der Bereich von C_{20} bis C_{40} weist hydrophoben Charakter auf; er ist frei von Hydroxylgruppen. Das Vorhandensein von hydrophoben und hydrophilen Bereichen erklärt die Ober-

flächenaktivität von PTX (Habermann und Chhatwal, 1982). Die große Zahl von 42 Hydroxylgruppen an dem flexiblen Molekül macht verständlich, weshalb alle Wirkungen von PTX (mit Ausnahme seiner Oberflächenaktivität) durch Borat in micromolaren Konzentrationen hundertfach und mehr verstärkt werden (Ahnert-Hilger et al., 1982; Chhatwal et al., 1982). Möglicherweise treten auch Wechselwirkungen mit Ca^{2+}-Ionen auf; zumindest wird Bindung (Habermann, 1983) und Wirkung (Chhatwal et al., 1982; Habermann und Chhatwal, 1982) von PTX durch dieses Ion verstärkt.

Das Interesse der Chemiker richtete sich bisher auf die Aufklärung der äußerst komplizierten Struktur. Fernziel ist seine Totalsynthese in vitro (Kishi, 1982). Pharmakologen sind hingegen von der biologischen Wirksamkeit des Toxins angezogen. Die LD_{50} liegt bei 150 ng/kg, wenn man es Mäusen i.v. appliziert (Moore und Scheuer, 1972). Bei Kaninchen liegt sie sogar nur um 25 ng/kg (Wiles et al., 1974).

Wegen dieser extremen Wirksamkeit wurde in PTX zunächst fälschlicherweise ein Neurotoxin vermutet. In der Tat depolarisiert PTX jede erregbare Membran. An Nerven erhöht es die Ruheleitfähigkeit für Natriumionen (Dubois und Cohen, 1977; Pichon, 1982; Muramatsu et al, 1984). Eine Membrandepolarisation findet man auch im Skelettmuskel (Deguchi et al., 1974, 1976), in glatter Muskulatur (Ito et al., 1976) und im Herzmuskel (Weidmann, 1977; Ito et al., 1979). Wie Untersuchungen von Muramatsu et al. (1984) am Tintenfisch Axon zeigen, wirkt PTX hier nur von der Außenseite der Membran.

PTX beeinflußt aber auch nicht-erregbare Zellmembranen, z.B. setzt es aus Ratten-Mastzellen Histamin frei; merkwürdig ist dabei eine glockenförmige Dosis-Wirkungskurve (Chhatwal et al., 1982).

Als besonders gutes Modell erweist sich der Erythrozyt. Hier führt PTX zu einem schnellen Kaliumaustritt, dem spät und in hohen Konzentrationsbereichen eine Hämolyse vom kolloid-osmotischen Typ folgt (Habermann et al.,1981). Ouabain verhindert den PTX-bedingten Kaliumaustritt bei Erythrozyten verschiedener Spezies (Habermann und Chhatwal, 1982). Das Glykosid hemmt auch die PTX-bedingte Kontraktion am Vas deferens zumindest partiell (Ishida et al., 1982 und 1985). ^{3}H-Ouabain läßt sich durch PTX von der Erythrozytenmembran verdrängen, was auf eine Beteiligung der Na^{+},K^{+}-ATPase schließen läßt. Dazu paßt, daß Hundeerythrozyten, denen die Na^{+},K^{+}-ATPase fehlt, unempfindlich sind gegenüber PTX (Habermann und Chhatwal, 1982). Weitere Untersuchungen an resealed ghosts (Chhatwal et al., 1983) ergaben , daß ATP für die Wirkung von PTX nötig ist.

Alle diese Beobachtungen führten zu dem Schluß, daß Palytoxin mit der erythrozytären Na^{+},K^{+}-ATPase reagiert. Das Enzym oder seine unmittelbare Umgebung wird dabei so verändert, daß die Permeabilität für kleine Kationen, unter anderem Kalium, erhöht wird (Chhatwal et al., 1983).

1.2. AUFGABENSTELLUNG

Die vorliegende Arbeit sollte die Wechselwirkungen von PTX mit dem Erythrozyten hinsichtlich Bindungsverhalten und Kaliumfreisetzung untersuchen. Dazu mußte radioaktiv markiertes Palytoxin hergestellt werden.

Die Charakterisierung der Bindung sollte weiteren Aufschluß über die Beteiligung der Na^+,K^+-ATPase an der PTX-Wirkung geben. Die Kompetition mit ^3H-Ouabain mußte als Vergleich herangezogen werden. Die Frage einer Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch PTX war erneut zu studieren, nachdem Habermann und Chhatwal (1982) zunächst negative Resultate erhalten hatten. Endziel war die Prüfung der Hypothese, daß - zumindest am Erythrozyten - die Na^+,K^+-ATPase das Angriffsziel von Palytoxin darstellt.

2. ABKÜRZUNGEN

AMP-PCP	β-γ-Methylen-adenosin-5'-triphosphat
ATP-γ-S	Adenosin-5'-(γ-thio)triphosphat
BSA	Serumalbumin vom Rind
Dansyl	Dimethylamino-1-Naphthalin-sulfonyl-
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminomethylen)-NN'-tetraessigsäure
EC_{50}	Konzentration, die benötigt wird um 50 % eines Effektes auszulösen
g	Erdbeschleunigung
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IC_{50}	Konzentration, die benötigt wird um eine Hemmwirkung von 50 % zu erzielen
IOV	inside-out Vesikel
K_D	Dissoziationskonstante
K_i	Inhibitorkonstante
k_{on}, k_{off}	Geschwindigkeitskonstanten der Hin- bzw. Rückreaktion
M	Molar (mol/l)
MgPBT	Puffer zur Bindung von ^{3}H-Ouabain
NHBC	Kaliumfreier Puffer zur Bestimmung der Kaliumfreisetzung und Bindung von Palytoxin
PEG	Polyethylenglykol
P_i	anorganisches Phosphat
PTX	Palytoxin
ROV	rightside-out Vesikel
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute

3. METHODEN UND SUBSTANZEN

3.1 HÄUFIG VERWENDETE LÖSUNGEN

Britton-Robinson : NaCl 150 mM, Borsäure 6 mM, Phosphorsäure 6 mM, Essigsäure 6 mM, gewünschter pH-Wert mit NaOH eingestellt.

Histidin/Sucrose : Histidin 30 mM, Sucrose 250 mM, pH 7.2 mit HCl eingestellt

Imidazolpuffer : Imidazol 25 mM, pH 7.0 mit HCl

MgPBT : $MgCl_2$ 5 mM, NaH_2PO_4 1 mM, Tris 10 mM, Borsäure 0.5 mM, pH 7.4 mit HCl

NBHC : NaCl 150 mM, Hepes 10 mM, $CaCl_2$ 1 mM, Borsäure 0.5 mM, pH 7.4 mit NaOH

NHBC-alb : NHBC mit 0.1 % Serumalbumin

NHB : NHBC ohne $CaCl_2$

NHC : NHBC ohne Borsäure

Ninhydrin : Ninhydrin 1 % (w/v) in n-Butanol (95 ml) und Eisessig (5 ml)

PEG-Lösung : PEG 6 000 10% in Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 mit HCl eingestellt

Protein-Lösung : Serumalbumin 0.5 %, γ-Globulin 0.5 % jeweils (w/v) in MgPBT

Tris : Tris 50 mM, pH 7.4 mit HCl eingestellt

Tris-Borat : Tris 50 mM, Borat 1 mM, pH 7.4 mit HCl eingestellt

3.2. PALYTOXIN UND DERIVATE

3.2.1. Natives Palytoxin

Palytoxin wurde von Beress et al. (1983) aus PALYTHOA caribaeorum gereinigt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.2.2. Darstellung von Palytoxin-Derivaten

Palytoxin (Molekulargewicht 2 680) weist eine freie Aminogruppe, 42 Hydroxylgruppen und 8 Doppelbindungen als mögliche Angriffspunkte für eine Derivatisierung auf. Über die Aminogruppe lassen sich das N-Acetyl- und das Dansyl-Derivat darstellen. Die Doppelbindungen stellen einen Angriffspunkt für die Markierung mit ^{125}Iod dar.
Nachfolgend sind die Bedingungen für die einzelnen Derivatisierungen beschrieben.

3.2.2.1. Markierung mit Dansylchlorid

Die Dansylmarkierung wird in Anlehnung an die für Aminosäuren beschriebene Methodik (Gray, 1972) durchgeführt. In einem Eppendorfgefäß werden 5 µl 0.2 M Natriumcarbonat pH 9.0 und 5 µl PTX (1 mg/ml in Wasser) vorgelegt und dessen

Derivatisierung mit 10 µl Dansylchlorid-Lösung (5 mg/ml in Aceton) gestartet. Nach 2 Stunden bei Raumtemperatur wird die Reaktion mit 480 µl NHBC-alb gestoppt. Diese Lösung wird bei 4°C aufbewahrt.

3.2.2.2. N-Acetylierung von Palytoxin

Die freie Aminogruppe von PTX wird nach Hirata et al. (1979) bzw. Uemura et al.(1980) selektiv mit p-Nitrophenylacetat acetyliert.
Das Reagens wird zu 10 mg/ml in Wasser mit 5 µl/ml Pyridin (v/v) gelöst. 5 µl PTX (1 mg/ml in Wasser) werden mit 10 µl dieser Lösung im Eppendorfgefäß gemischt und 20 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird mit NHBC-alb auf 500 µl aufgefüllt und bei 4°C aufbewahrt.

3.2.2.3. Radioaktive Markierung mit ^{125}Iod

PTX wurde nach Hunter und Greenwood (1962) mit Iod markiert. Im Prinzip wird dabei mithilfe von Chloramin T elementares ^{125}Iod hergestellt, das sich vermutlich an die Doppelbindungen von Palytoxin anlagert.

Folgende Lösungen werden für die Iodierung vorbereitet :

Natriumphosphat	0.5 M, pH 7.5
PTX	200 µg/ml in Wasser
Chloramin T	0.2 mg/ml in Wasser
Natriumdisulfit	1.0 mg/ml in Wasser

In Vorversuchen wurde eine optimale Konzentration von 0.2 mg/ml Chloramin T ermittelt. Eine Steigerung der Chloramin T Konzentration führte bei gleichbleibendem Iodeinbau zu einer Abnahme der biologischen Aktivität. Die fünffach höhere Konzentration hatte noch 65 % der Wirksamkeit im Vergleich zu 0.2 mg/ml Chloramin T. Niedrigere Konzentrationen ergaben einen geringen Iodierungsgrad.

In ein silikonisiertes Reagenzglas (35 x 8 mm) werden vorgelegt :

PTX-Lösung	7 µl	(1.4 µg = 0.52 nmol)
Phosphatpuffer	10 µl	
$Na^{125}I$	20 µl	(2 mCi, rund 1.2 nmol)

Die Reaktion wird bei Raumtemperatur mit 5 µl Chloramin T (4 nmol) gestartet. Nach der Zugabe wird kräftig geschüttelt und in Abständen von jeweils 30 Sekunden werden noch dreimal jeweils 5 µl Chloramin T zugegeben; die stufenweise Zugabe hatte sich bei früheren Versuchen in diesem Labor als vorteilhaft erwiesen, weil dadurch die Bildung von Iodat gering gehalten wird. 30 Sekunden nach der letzten Zugabe beendet man die Reaktion durch Hinzufügen von 20 µl Natrium-disulfit (100 nmol). Es wird mit Tris-Albuminpuffer (Tris 50

mM, Serumalbumin 0.1 % (w/v), pH 7.4 mit HCl) auf 250 µl aufgefüllt und ein 5 µl Aliquot zur Bestimmung der biologischen Aktivität anhand der Kaliumfreisetzung (s. 3.4.2.) entnommen.

Der verbleibende Reaktionsansatz wird bei Raumtemperatur an Sephadex G 10 fine mit Tris-Albuminpuffer als Elutionsmittel aufgetrennt (Säulendimension 400 x 10 mm). Das Eluat wird in Fraktionen zu 550 µl gesammelt. Von jeder Fraktion entnimmt man ein 5 µl Aliquot, verdünnt auf 500 µl mit NHBC-alb und bestimmt das Elutionsprofil für Radioaktivität, biologische Aktivität (s. 3.4.2.) und Bindungsfähigkeit (s. 3.6.1.1.), sowie das Laufverhalten in der Dünnschicht-Chromatographie. Der Albuminzusatz ist bei verdünnten (1 µg/ml und weniger) PTX-Lösungen unentbehrlich, weil die Gefahr unspezifischer Bindungen an Glas und Plastikmaterial (Gefäße, Pipetten) und - bei Bindungsversuchen - an unspezifische Bindungsstellen besteht.

3.2.2.4. Affinitätsreinigung der Iodierungsprodukte

Um das Ausmaß der spezifischen Bindung sowie die Einheitlichkeit des Iodierungsproduktes zu erhöhen, wurde es nach der Gelfiltration an eine ATPase-reiche Präparation von Nierenmembranen adsorbiert und mit Essigsäure desorbiert. Dieses Verfahren wurde von Nissenson und Arnaud (1978) für die Reinigung von ^{125}I-Parathormon, ebenfalls an Nierenmembranen, beschrieben.

Nierenmembranen (20 mg Protein, Darstellung s. 3.5.5.) werden durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 18 000 Upm (39 000 x g) und 4°C im SS 34 Festwinkelrotor in Tris-Borat überführt. Das Membranpellet wird in 3 ml dieses Puffers resuspendiert und für 30 Minuten bei 350 Hz und 37°C im Rundschüttelwasserbad mit 20 bis 30 µCi ^{125}I-PTX (70 bis 100 ng) Fraktion 1 aus der Gelfiltration inkubiert. Nach Ende der Inkubation wird 20 Minuten bei 20 000 Upm (48 000 x g) und 4°C abzentrifugiert und das Pellet noch 2 mal mit je 6 ml Tris-Borat-Puffer, dem 1 % Serumalbumin zugesetzt ist, nachgewaschen. Schließlich wird das Pellet in 2 ml 0.1 M Essigsäure resuspendiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation für 30 Minuten bei 20 000 Upm und 4°C wird der Überstand abpipettiert und nach dem Neutralisieren mit Natronlauge bei 4°C aufbewahrt.

3.3. CHARAKTERISIERUNG DER PALYTOXINDERIVATE

3.3.1. Dünnschicht-Chromatographie

Palytoxin und seine Derivate können mittels der Dünnschicht-Chromatographie von anderen Substanzen getrennt werden. In der Regel werden 5 µg von PTX und seinen Derivaten, bzw. 1

µl der säulenchromatographisch erhaltenen Fraktionen aufgetragen. Zwei Laufsysteme wurden angewandt.

I : Kieselgelplatten (SI, Riedel-de Haen, Hannover) mit dem Laufmittel n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (30:20:6:24)

II : HPTLC-Platten (Kieselgel NH_2F_{254s} precoated, Merck, Darmstadt) mit dem Laufmittel 1-Pentanol/Pyridin/Wasser (7:7:6)

Die Kieselgelplatten werden mit Ninhydrin besprüht und bei 150°C entwickelt. Zum Nachweis radioaktiv markierter Verbindungen wird ein Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR) über Nacht bei -20°C aufgelegt. Die Entwicklung und Fixierung erfolgte mit dem Agfasystem G153/353 nach der Werksvorschrift.

Die R_f-Werte für PTX sind 0.44 bei I und 0.28 bei II.

3.3.2. Bestimmung des Kaliumaustritts aus Erythrozyten

Die biologische Aktivität von PTX und seinen Derivaten wird durch deren Fähigkeit charakterisiert, den Kaliumaustritt aus menschlichen Erythrozyten zu fördern (Ahnert-Hilger et al., 1982).

Gewaschene Erythrozyten (s.3.4.1.) werden zu 1.5 % in NHBC resuspendiert und auf Eis aufbewahrt. PTX-Verdünnungen und Verdünnungen der Derivate oder Inhibitoren werden in NHBC-alb angesetzt.

50 µl PTX-Verdünnung werden in ein Plastikröhrchen (75 x 11 mm) vorgelegt. Dann werden 3 ml Erythrozytensuspension zuge-

geben und 30 Minuten bei 37°C und 300 Hz im Rundschüttelwasserbad inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 5 Minuten 1 000 x g wird im Überstand das Kalium mittels einer kaliumsensitiven Elektrode (Orion, Lorch) mit einem mV-Meter (PHM 84 von Radiometer) bestimmt. Die in den Erythrozyten enthaltene Gesamtmenge an Kalium wird durch Erhitzen der Erythrozytensuspension auf 95°C bestimmt und dieser Wert als 100 % gesetzt. Der durch PTX und dessen Derivate evozierte Kaliumaustritt wird anhand einer K^+-Eichkurve bestimmt und auf diesen Totalwert bezogen.

3.3.3. Bestimmung der spezifischen Aktivität des Tracers

Da die üblichen Methoden zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von Proteinen, z.B. Fällbarkeit, für ^{125}I-PTX nicht geeignet sind, wird die spezifische Aktivität über das "self-displacement" oder die biologische Aktivität des Tracers bestimmt. Dazu muß vorausgesetzt werden, daß sowohl markiertes wie auch unmarkiertes Toxin sich am Rezeptor identisch verhalten und dieselbe biologische Wirkung entfalten. Dies scheint gerechtfertigt, da hemmende und fördernde Einflüsse anderer Substanzen sowohl die Wirkung von PTX wie auch die Bindung von ^{125}I-PTX gleichermaßen betreffen.

3.3.3.1. Ermittlung von Konzentrationen und spezifischer Radioaktivität des Tracers mittels "self-displacement"

Bei diesem Verfahren (Roulston, 1979; Dias und Reichert, 1982) wird die spezifische Aktivität an bindbarem ^{125}I-PTX ermittelt.

Erythrozyten (0.3 % in NHBC) werden mit steigenden Mengen an ^{125}I-PTX bzw. einer festen Menge an ^{125}I-PTX (ca. 20 fmol) und verschiedenen Konzentrationen an unmarkiertem PTX unter Standardbedingungen (s. 3.5.1.1.) inkubiert und filtriert.

Trägt man nun die jeweils gebundene Radioaktivität gegen die Menge an eingesetztem PTX bzw. die eingesetzte Radioaktivität von ^{125}I-PTX auf, so werden Kurven erhalten für

1. die kompetitive Hemmung der ^{125}I-PTX - Bindung durch unmarkiertes PTX und
2. die Sättigung mit steigenden Mengen an ^{125}I-PTX.

Unter der Annahme, daß sich sowohl markiertes wie unmarkiertes PTX an der Bindungsstelle gleich verhalten, sind die zur halbmaximalen Wirkung (d.h. 50 % Bindung) nötigen Konzentrationen beider gleich. Somit läßt sich über den Quotienten aus den EC_{50}-Werten (Sättigung/Kompetition) die spezifische Radioaktivität berechnen.

3.3.3.2. Ermittlung von Konzentrationen und spezifischer Radioaktivität des Tracers mittels Kaliumaustritt aus Erythrozyten

Ziel ist die Bestimmung des biologisch aktiven ^{125}I-PTX. Dazu werden wie unter 3.3.2. beschrieben die Erythrozyten mit verschiedenen Konzentrationen ^{125}I-PTX inkubiert. In einem Parallelansatz wird der Kaliumaustritt für eine Eichreihe von nativem PTX bestimmt.
Aus den erhaltenen Konzentrations-Wirkungskurven wird die jeweilige EC_{50} abgelesen, wiederum deren Quotient wie in 3.3.3.1. gebildet und hieraus die spezifische Radioaktivität berechnet.

3.4. G E W I N N U N G V O N E R Y T H R O - Z Y T E N U N D M E M B R A N E N

3.4.1. Darstellung intakter Erythrozyten

Menschliches Citratblut (1 % Trinatriumcitrat) wird bei 1 000 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Plasma sowie die Leukozytenschicht werden abgesaugt. Das Zellpellet wird noch dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Die Zellen werden schließlich im gewünschten Puffer, in der Regel NHBC, resuspendiert und im Eisbad aufbewahrt.

3.4.2. ATP-Verarmung (Depletion) von Erythrozyten

Depletionsmedium : Cholinchlorid 120 mM, NaCl 10 mM, KCl 10 mM, Tris 10 mM, $MgCl_2$ 1 mM, EGTA 0.1 mM, pH 7.5 mit HCl eingestellt. In Kontrollansätzen wird diesem Medium Glucose 11 mM zugesetzt.

Um die Erythrozyten an internem ATP zu verarmen, werden sie nach dem Verfahren von Eisner und Richards (1981) behandelt. Eine 10 %ige Erythrozytensuspension wird in Depletionsmedium ohne Glucose 12 Stunden bei 37°C im Rundschüttelwasserbad bei 250 Hz inkubiert. Um eine nahezu völlige ATP-Verarmung zu erreichen, werden für weitere 3 Stunden Inosin und Iodacetamid (jeweils 5 mM Endkonzentration) zugesetzt. Nach dieser Inkubation werden die Erythrozyten noch dreimal mit NHBC gewaschen und schließlich darin resuspendiert. Ein Ansatz, der statt Depletionsmedium glucosehaltige Lösung und weder Inosin und Iodacetamid enthält, wird als Kontrolle mitgeführt.

3.4.3. Darstellung von Erythrozytenmembranen nach Dodge et al. (1963)

Erythrozyten aus menschlichem Citratblut werden mit 166 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.4 dreimal gewaschen, zu 5 % in Puffer resuspendiert, für 20 Minuten auf Eis gestellt und 20

Minuten bei 5 000 Upm (3 000 x g) und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird mit dem 15 fachen Volumen Phosphatpuffer (Natriumphosphat 7 mM, pH 7.4) versetzt und kurz kräftig geschüttelt. Danach wird 20 Minuten bei 12 500 Upm (17000 x g) zentrifugiert und das Pellet noch 4 - 5 mal mit demselben Puffer gewaschen. Es hat dann eine fast weiße Farbe. Schließlich wird dieses Pellet zu 5 mg/ml Protein im Puffer resuspendiert und tiefgefroren bei - 20°C aufbewahrt.

3.4.4. Darstellung von inside-out Vesikeln nach Lew et al. (1982)

Benötigte Lösungen :

Effluxmedium : NaCl 50 mM, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, Hepes 25 mM, Borsäure 0.5 mM, pH 7.5 mit NaOH eingestellt

Lysemedium : Hepes 2.5 mM, EGTA 0.5 mM, pH 7.5 mit NaOH eingestellt

Die gewaschenen Erythrozyten (ca. 80 % Hämatokrit) werden für 10 Minuten in dem 40fachen Volumen an eiskaltem Lysemedium gehalten und dann 15 Minuten bei 4°C und 20 000 x g zentrifugiert. Der Bodensatz wird in 2 - 5 ml eiskaltem Lysemedium resuspendiert. Wenn ^{86}Rubidium eingeschlossen werden soll, werden an dieser Stelle 20 µCi $^{86}Rb^+$ zugefügt. Nun wird 60 Minuten bei 37°C inkubiert, wobei sich die von

Lew et al. beschriebenen Vesikel bilden. Um eine in der Grösse homogene Population an Vesikeln zu erhalten, wird die Suspension 5 mal durch eine 23G Kanüle aufgezogen und ausgepreßt ("needling"). Die Suspension wird für 10 Minuten bei 4°C und 20 000 x g zentrifugiert und das Vesikelpellet noch zweimal mit eiskaltem Effluxmedium bzw. Puffer gewaschen. Schließlich wird es zu 30 % Hämatokrit (bezogen auf die ursprüngliche Menge an Erythrozyten) resuspendiert und unmittelbar nach Herstellung verwendet; die Stabilität der Vesikel ist beschränkt.

3.4.5. Darstellung von Nierenmembranen

Membranen, die eine hohe Na^+,K^+-ATPasen-Aktivität zeigen, werden nach der von Jorgensen (1974) beschriebenen Methode aus Schweinenieren gewonnen.

Nieren frisch geschlachteter Tiere werden in eiskaltem Histidin/Sucrose-Puffer (s. 3.1.) aufbewahrt. Die dunkelrote, äußere Zone des Marks wird herauspräpariert und gewogen. Das Gewebe wird zu 10 % (w/v, bezogen auf das Feuchtgewicht) in Histidin/Sucrose suspendiert, zweimal 10 Sekunden lang im Waring Blendor bei der Höchstdrehzahl grob zerkleinert, und mit dem Potter-Homogenisator bei 1 000 Upm und 4°C weiterhomogenisiert. Es wird für 15 Minuten bei 6 000 x g und 4°C im Festwinkelrotor zentrifugiert, der Überstand bei 4°C aufbewahrt, das Pellet im halben Volumen

Puffer nachhomogenisiert und erneut zentrifugiert. Die vereinigten Überstände werden nun bei 48 000 x g und 4°C zentrifugiert, das lockere Pellet in Histidin/Sucrose resuspendiert, ein weiteres Mal mit dem Potter-Homogenisator homogenisiert und zentrifugiert. Das danach erhaltene lockere, hellbraune Pellet wird zu 10 - 20 mg/ml Protein in diesem Puffer resuspendiert und bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt.

3.4.6. Präparation sonstiger Membranen

Membranen aus Niere, Herz, Skelettmuskel und Hirn (Cortex) der Ratte werden identisch dargestellt.

5 Ratten werden durch Genickbruch getötet, entblutet und die entsprechenden Gewebe entnommen. Sie werden zu 10 % (w/v) in 20 mM $NaHCO_3$ gegeben und 15 Sekunden bei halbmaximaler Geschwindigkeit mit dem Ultraturrax homogenisiert. Nach einer Verdopplung des Volumens mit diesem Puffer wird 15 Minuten bei 20 000 Upm (48 000 x g) und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 30 ml Tris aufgenommen und noch zweimal wie oben nachhomogenisiert. Zum Schluß werden die Pellets zu etwa 10 mg/ml Membranprotein in Tris aufgenommen und bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt.

3.5. B I N D U N G S V E R S U C H E

Im folgenden werden die Methoden zur Bindung von ^{125}I-PTX und ^{3}H-Ouabain an Erythrozyten und Membranen beschrieben.

3.5.1. Bindung von ^{125}I-Palytoxin

Wenn nicht besonders erwähnt werden diese Versuche in NHBC (s. 3.1.) durchgeführt, um gleiche Bedingungen wie bei der Messung des Kaliumaustritts (s. 3.3.2.) herzustellen. Der verwendete Waschpuffer besteht aus NHBC, dem 1 % Serumalbumin zugesetzt wird.

3.5.1.1. Bindung an intakte Erythrozyten und deren Membranen

Im Standardassay werden menschliche Erythrozyten zu 1 % in NHBC resuspendiert. Der Tracer bzw. die Inhibitoren werden in NHBC-alb zugegeben. Dann wird der Bindungsversuch durch die Zugabe der Erythrozyten- oder Membransuspension gestartet. Eventuelle Abweichungen sind bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

Pipettierschema : 50 µl Tracer (ca. 10 bis 25 fmol)
50 µl Puffer mit oder ohne Inhibitor
200 µl Erythrozyten- bzw. Membransuspension

Alle Bestimmungen werden als Triplikate durchgeführt. Nach Ende der 30 Minuten währenden Inkubation bei 37°C werden 3 ml eiskalter Waschpuffer zugegeben und sofort durch Glasfaserfilter (Whatman GF/C, 1 Filter) filtriert. Die Filter werden noch zweimal mit jeweils 3 ml Waschpuffer nachgespült und dann die Radioaktivität im Gamma-Counter (MR 1032 Auto Gamma Counting System der Fa. Kontron) erfaßt. Die Zählausbeute liegt bei 54 %.
Wenn die Bindung durch Substanzen (z.B. Nukleotide) verändert werden soll, werden diese aus Stammlösungen zu den Suspensionen gegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Versuche mit Erythrozytenmembranen werden analog angeordnet. Die identische Konzentration an Membranprotein betrug 0.5 mg/ml.

3.5.1.2. Bindung an andere Membranen

Membranen werden, wenn nicht besonders erwähnt, zu 0.5 mg/ml Protein in Tris-Borat suspendiert und der gesamte Bindungsansatz auf dieses Puffersystem umgestellt. Die Bindungsbedingungen sind dieselben wie in 3.5.1.1.

3.5.2. Bindungsversuche mit ^{3}H-Ouabain

3.5.2.1. Bindung an Erythrozyten und deren Membranen

Für die Bindungsversuche mit ^{3}H-Ouabain werden die Erythrozyten zu 10 % in NHBC resuspendiert. Die Erythrozytenmembranen werden zu 0.5 mg/ml Protein in NHBC bzw. MgPBT (s. 3.1.) resuspendiert. Der Aufbau des Bindungsversuches ist analog zu 3.5.2.1., wobei die Inkubationszeit auf 4.5 Stunden wegen der anderen Assoziationskinetik von Ouabain verlängert wird.

3.5.2.2. Bindung an Nierenmembranen

Mittels SDS aktivierte Nierenmembranen (s. 3.6.1.) werden zu 70 µg/ml in MgPBT (s. 3.1.) resuspendiert. In Analogie zu 3.5.2.1. werden Tracer und Inhibitoren in MgPBT mit 0.1 % Serumalbumin eingesetzt. Als Inkubationszeit werden bei 37°C 90 Minuten benötigt um das Gleichgewicht einzustellen. Dann werden die Proben auf Eis gestellt, 100 µl Proteinlösung (s. 3.1.) und 3 ml PEG-Lösung zugegeben. Nach einer Fällungszeit von 10 Minuten wird durch Glasfaserfilter (Whatman GF/C, 1 Filter) filtriert und noch zweimal mit PEG-Lösung nachgewaschen. Die Filter werden mit Instagel (Packard Instruments) versetzt und 2 Stunden bei 4°C geschüttelt. Anschließend wird im Beta Counter (Tricarb 2660 von Packard) die gebundene Radioaktivität bestimmt.

3.5.3. Auswertung der Bindungsversuche

Die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor läßt sich nach dem Massenwirkungsgesetz beschreiben:

$$R + L \underset{k_{on}}{\overset{k_{off}}{\rightleftharpoons}} RL$$

wobei R den unbesetzten Rezeptor, L den Liganden und RL den Komplex aus beiden darstellen. Unter Gleichgewichtsbedingungen gilt dann :

$$\frac{[R \times L]}{[RL]} = K_D \qquad I$$

Zum anderen läßt sich die Dissoziationskonstante K_D über die Geschwindigkeitskonstanten bestimmen nach

$$\frac{k_{off}}{k_{on}} = K_D \qquad II$$

3.5.3.1 Sättigungsanalyse

Da über das Molekulargewicht und die Konzentration des Rezeptors keine Aussage gemacht werden kann, läßt sich nach Scatchard (1949) bzw. Rosenthal (1967) aus der Gleichung (I) folgende Beziehung herstellen :

$$\frac{[RL]}{[L]} = \frac{[R]}{K_D} = \frac{[R_T]}{K_D} - \frac{[RL]}{K_D} \qquad 1$$

Dies gilt, da die Gesamtmenge R_T des Rezeptors sich stets aus der Summe von freiem und besetztem Rezeptor zusammensetzt.

Wird nun R L = B(ound), L = F(ree) und $R_T = B_{max}$ gesetzt, so ergibt sich die Gleichung :

$$\frac{B}{F} = -\frac{1}{K_D} B + \frac{B_{max}}{K_D} \qquad 2$$

Diese Gleichung ist graphisch auswertbar, wobei K_D den negativen reziproken Wert der Geradensteigung und B_{max} den Schnittpunkt mit der Abszisse darstellt.

3.5.3.2. Assoziationsgeschwindigkeitskonstante

Die Gleichung (I) läßt sich umwandeln in

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_{on}[RL] - k_{off}[RL] \qquad 3$$

Betrachtet man nun die Ligandenkonzentration als konstant, so wird weiterhin mit $k'_{on} = k_{on} \times L_T$

$$\frac{dB}{dt} = k'_{on}[R] - k_{off} B \qquad 4$$

Wird die Reaktion bis zum Equilibrium betrachtet, so ist B zu jeder Zeit mit der Equilibriumskonzentration B_e verknüpft durch

$$\ln \frac{B_e}{B_e - B} = (k'_{on} - k_{off}) \times t = k_{ob} \times t \qquad 5$$

k_{ob} ist die scheinbare Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion. Eine ausführliche Herleitung dieser Beziehungen findet man bei Williams und Lefkowitz (1978).
Die graphische Analyse ergibt dann k_{ob}. Bestimmt man in unabhängigen Versuchen die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{off}, so kann nach

$$k_{ob} - k_{off} = k'_{on} = k_{on} \times L_T \qquad 6$$

die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{on} bestimmt werden.

3.5.3.3. Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

Die Dissoziation des Liganden von seinem Rezeptor kann erreicht werden durch eine Verdünnung des Bindungsansatzes (50faches Volumen) oder durch die Zugabe von einem Überschuß an unmarkiertem Liganden. In beiden Fällen ergibt sich die Gleichung (3) zu

$$\frac{dB}{dt} = -k_{off} \times B \qquad 7$$

Dies ist die Gleichung für eine Reaktion erster Ordnung. Wenn $B = B_o$ zum Zeitpunkt $t = 0$ (Start der Dissoziation) ist, ergibt die Integration von (7)

$$\ln \frac{B}{B_o} = -k_{off} \times t \qquad 8$$

d.h. eine graphische Analyse ergibt eine Gerade mit der Steigung $-k_{off}$.

3.5.3.4. Hemmkonstanten

Hemmkonstanten lassen sich aus der IC_{50} nach Cheng und Prusoff (1973) mit der folgenden Gleichung bestimmen

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + L/K_D}$$

3.6. BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT DER NA^+, K^+-ATPASE

Benötigte Lösungen :

ATP-Lösung : Tris-ATP 4 mM in Tris mit einem Zusatz von ca. 35 kBq ^{32}P-ATP

BSA-Lösung : Serumalbumin 0.3 % in Imidazolpuffer

Lösung A : $MgCl_2$ 4.32 mM, EDTA 0.36 mM, NaCl 400 mM, KCl 80 mM, Tris 80 mM, pH 7.4 mit HCl

Lösung B : Statt NaCl und KCl Cholinchlorid 480 mM

Lösung 1 : n-Butanol / Benzol (1/1) (v/v)

Lösung 2 : Kaliumphosphatpuffer 1 mM , pH 7.4

Lösung 3 : Wolframatokieselsäure 20 mM in 0.02 N Schwefelsäure

Lösung 4 : Ammoniummolybdat 5 % (w/v) in 4 N Schwefelsäure

SDS-Lösung : SDS 0.65 mg/ml, BSA 1 % (w/v) in Imidazolpuffer

3.6.1. Aktivierung der Nierenmembranen

Um die maximale Aktivität der Na^+,K^+-ATPase in Membranen zu erreichen, wird nach Forbush (1983) mit SDS aufgeschlossen. Zu 100 µg Membranprotein werden 100 µl SDS-Lösung gegeben und 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Danach wird mit der BSA-Lösung auf 1.4 ml aufgefüllt und diese Suspension auf Eis aufbewahrt.

3.6.2. Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Um identische Verhältnisse bei der Bestimmung der ATPasen-Aktivität zu erhalten, werden auch Erythrozytenmembranen mit SDS aufgeschlossen. Man erhält bei Erythrozytenmembranen auch ohne Aufschluß dieselben Werte.

Es wird das Verfahren von Siegel und Albers (1967) verwendet, wobei die Hydrolyse von γ-^{32}P-ATP bestimmt wird.

Pipettierschema :
- A. 10 µl Lösung A oder B
- B. 10 µl Enzymsuspension
- C. 10 µl Hemmstoff oder Puffer
- D. 10 µl ATP-Lösung

Der Versuch wird in Eppendorfgefäßen durchgeführt. A. - C. werden in das Gefäß vorgelegt und 5 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Hydrolysereaktion wird durch die Zugabe der ATP-Lösung gestartet und läuft 10 Minuten bei 37°C. Durch die Zugabe von 500 µl Lösung 1, 200 µl Lösung 2, je 100 µl Lösung 3 und 4 wird die Hydrolyse gestoppt. Das hydrolysierte Phosphat gelangt bei dieser Methodik in die

organische Phase. Hiervon wird ein Aliquot entnommen und die Radioaktivität im Beta-Counter über die Czerenkov-Strahlung bestimmt. Die Differenz von gebildetem ^{32}P-Phosphat in den Lösungen A u B ist proportional der Menge an Na^+,K^+-abhängig hydrolysiertem ATP. Sie wird auf nmol P_i x mg^{-1} x min^{-1} umgerechnet.

3.7. BESTIMMUNG DES RUBIDIUM-EFFLUXES AUS VESIKELN

Die nach 3.4.4. dargestellten und mit $^{86}Rubidium$ aufgeladenen Vesikel werden bei 37°C inkubiert. Mit dieser Temperaturerhöhung wird der Efflux gestartet und durch die Entnahme von Aliquots aus dem Inkubationsansatz zeitabhängig verfolgt. Die in den Vesikeln vor Beginn der Inkubation enthaltene Radioaktivität wird als 100 % Wert gesetzt. Alle folgenden Werte werden darauf bezogen. Zur Untersuchung verschiedener Substanzen an einer einzigen Vesikelpopulation werden 200 µl bzw. 50 µl Aliquots mit den entsprechenden Substanzen bei 37°C für 45 Minuten inkubiert. Zur Bestimmung des $^{86}Rb^+$-Gehaltes in den Vesikeln werden entweder 200 µl Aliquots durch Membranfilter (BA 85 0.45 µm von Schleicher und Schüll) gesaugt und dreimal mit 3 ml Effluxmedium nachgespült. Man kann auch 50 µl Aliquots über kleine Kationenaustauschersäulen (Pasteurpipetten, 1.5 cm Höhe, Dowex 50 W AG in der Tris-Form) geben und mit eis-

kalter 200 mM Sucroselösung direkt in die Zählgefäße eluieren. Die Zählung der Proben erfolgt nach Zugabe von 10 ml Instagel im Beta-Counter. Beide Verfahren liefern identische Ergebnisse.

4. ERGEBNISSE

4.1. DERIVATISIERUNGEN

Die Derivatisierung von Palytoxin verfolgt zwei Ziele :

1. Die Ermittlung von Struktur-Aktivitätsbeziehungen.
2. Die Gewinnung eines radioaktiv markierten Derivates für Bindungsstudien.

Alle Derivate wurden daher auch auf verbliebene biologische Aktivität untersucht. Gemessen wurde der Kaliumaustritt aus Erythrozyten.

4.1.1. Derivatisierung der freien Aminogruppe

Nach Kudo und Shibata (1980) besitzt das N-Acetylderivat nur noch etwa 1 % der biologischen Aktivität des nativen Moleküls wenn die Depolarisation von Nervenzellen aus dem Rückenmark des Frosches als Maß genommen wurde. Entsprechend waren das von uns hergestellte N-Acetyl-PTX und auch Dansyl-PTX sehr viel schwächer wirksam als PTX, wenn wir den Kaliumaustritt am Erythrozyten bestimmten. Die EC_{50}-Werte sind in der Tabelle 1 zusammengestellt, eine graphische Darstellung der Dosis-Wirkungskurve zeigt die Abbildung 2. Die Dosis-Wirkungskurven von Palytoxin und seinen Derivaten verlaufen parallel. Eine Charakterisierung der Reaktionsprodukte zeigt die Abbildung 3. Der Umsatz ist zu mindestens 95 % komplett, denn es ist jeweils der Ninhydrin-positive Fleck des PTX bei den Derivaten verschwunden.

Tab. 1 EC_{50}-Werte von PTX und seinen N-Acyl-Derivaten für den Kaliumaustritt sowie IC_{50}-Werte für die Kompetition mit ^{125}I-PTX am Erythrozyten.

SUBSTANZ	EC_{50} (M)	IC_{50} (M)
PTX	1.2×10^{-12}	8.6×10^{-11}
N-ACETYL-PTX	1.0×10^{-11}	7.4×10^{-10}
DANSYL-PTX	1.2×10^{-9}	6.0×10^{-8}

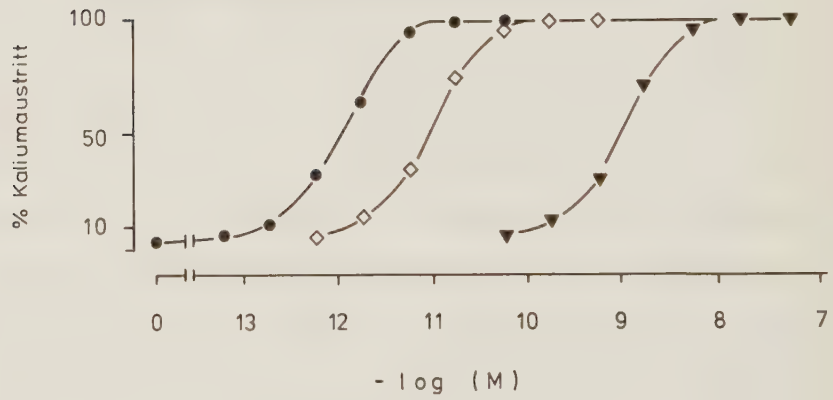

Abb. 2 Dosis-Wirkungskurven für PTX und seine Derivate, erfaßt am Kaliumaustritt am Erythrozyten. PTX (●), Dansyl-PTX (▼) und N-Acetyl-PTX (◇) werden unter Standardbedingungen (s. 3.3.2.) mit den Erythrozyten inkubiert und das Kalium im Überstand bestimmt.

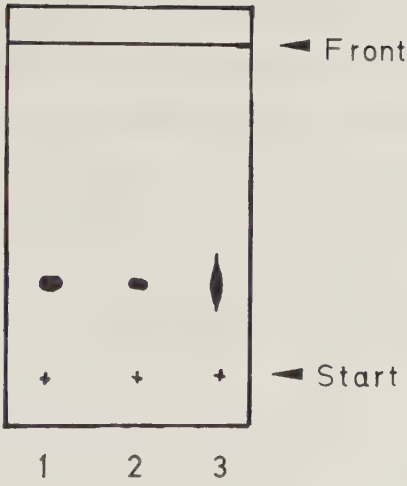

Abb. 3 Dünnschicht-chromatographische Reinheitsprüfung mit jeweils 5 µg PTX (1), N-Acetyl-PTX (2) und Dansyl-PTX (3).
Es wird an HPTLC-Platten mit 1-Pentanol/Pyridin/Wasser (7:7:6) getrennt.

Das N-Acetylderivat zeigt denselben R_f-Wert wie das native Molekül, während das Dansylderivat nicht ideal läuft (deutliche Spindelform). Wie in 4.2.4.3. noch besprochen wird, zeigen diese Derivate im Vergleich zu PTX auch eine schwächere Kompetition zu ^{125}I-PTX (s. Tabelle 1 und Abbildung 17).

Die bekannte (Kudo und Shibata, 1980) Veränderung in der biologischen Aktivität findet man also auch am Erythrozyten, wobei die Dansylierung die Wirksamkeit stärker beeinflußt. Je größer die über das Aminoende von PTX eingebrachte Gruppe ist, um so schwächer scheinen diese Derivate im Vergleich zum nativen Molekül zu wirken. Der Versuch, über die Aminogruppe ein radioaktives Isotop ins PTX-Molekül einzuführen führt zu einem nicht erträglichen Verlust an Wirksamkeit.

4.1.2. Iodmarkierung von Palytoxin

Für PTX liegen bereits Bindungsstudien vor, die aber mit einem umständlichen, ungenauen und wenig aussagekräftigen Bio-Assay erhoben wurden (Habermann, 1983). Das Ziel der vorliegenden Arbeit - Aufklärung des Wirkungsmechanismus von PTX im Zusammenhang mit der Na^+,K^+-ATPase und der Zellpermeabilität - erforderte einen radioaktiven Tracer. Er mußte wie PTX binden und wirken. Radioaktive Markierungen sind eine Voraussetzung dafür, daß biologische Wirkungen mit einer Substanzbindung, z.B. an der Zelloberfläche korreliert werden können.

Da für den Kaliumaustritt am Erythrozyten Mengen um 1 fmol/ml ausreichen, mußte Radioiod eingesetzt werden; nur dieses Isotop erbringt eine hinreichende spezifische Radioaktivität. Das Kernstück der vorliegenden Arbeit ist also die erstmalige Herstellung von radioaktivem Palytoxin.

Eine Markierung am freien Aminoende schied aus, weil der-

artige Derivate ihre biologische Aktivität größtenteils einbüßen (s. Tabelle 1). Überdies mißlangen alle Versuche PTX mit Bolton-Hunter's Reagenz umzusetzen. Tyrosyl- und Histidylreste fehlen.

Jüngst ist aber für Arachidonsäure die Markierung mit ^{125}Iod über die Doppelbindungen gezeigt worden (Turk et al., 1983). Auf analoge Weise läßt sich PTX mittels der Chloramin T Methode iodieren.Durch die Iodierung sinkt die biologische Aktivität des eingesetzten Palytoxins auf 21 $\pm$ 5 % (n = 7). Die Einbaurate beträgt 17 $\pm$ 4 % (n = 7), bezogen auf die eingesetzte Radioaktivität. Die errechnete spezifische Radioaktivität (560 Ci/mmol) erlaubt die Berechnung, daß statistisch 0.28 Atome Iod pro Molekül eingebaut wurden. Mehrfachiodierungen sind jedoch zu erwarten.

4.1.2.1. Säulenchromatographische Reinigung des iodierten Palytoxins

Nicht umgesetztes Iodid und andere Verunreinigungen werden durch die Gelfiltration an Sephadex G 10 fine von markiertem und unmarkiertem PTX getrennt. In der Abbildung 4 ist das typische Elutionsprofil dargestellt.

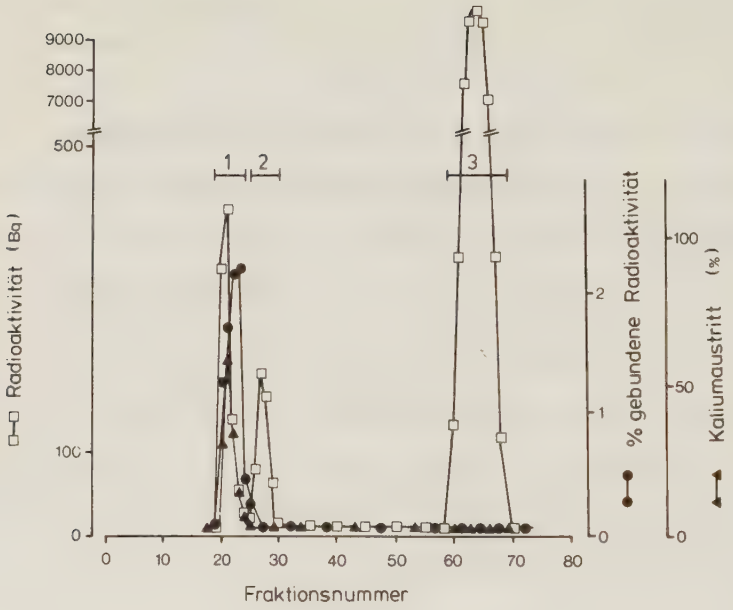

Abb. 4 Reinigung von ^{125}I-PTX an Sephadex G 10 fine.

Fraktionsvolumina 0.55 ml, Elutionsmittel Tris-Albumin-Puffer (0.1 % Albumin), Säulendimension 10 x 400 mm. Verlauf der Radioaktivität (□), der biologischen Aktivität (▲) und prozentualer Anteil der bindbaren Radioaktivität (●) sind aufgetragen.

Der eigentlichen PTX-Fraktion (biologische Aktivität und bindbare Radioaktivität, Fraktionen 20 - 24) folgt ein zweiter Radioaktivitätspeak (Fraktionen 26 - 30), der weder

bindbare Radioaktivität noch biologische Aktivität enthält und verworfen wurde. Er stellt entweder "totiodiertes", d.h. höher iodiertes, und deshalb biologisch inaktives PTX oder eine Verunreinigung dar, die in der Dünnschicht-Chromatographie nicht als Ninhydrin-positive Substanz erscheint. Radioaktivitätseinbau und biologische Aktivität verlaufen bei der Gelfiltration parallel. Der Gipfel der bindbaren Radioaktivität ist dagegen um 1 - 2 Fraktionen verschoben, was auf eine mögliche Retardation höher iodierten Palytoxins schließen läßt. Eine Retardation von iodierten Peptiden an Sephadex ist bekannt (Habermann und Fischer, 1979; Martin, 1982) und mag auf der Hydrophobizität von Iodatomen beruhen. Eine weitere Auftrennung nach diesem Prinzip, z.B. an Sephadex G 15 oder G 25 gelang nicht. Die DC-Trennung einzelner Fraktionen dieses Säulenlaufes mit anschließender Autoradiographie (Abbildung 5) zeigt gleichfalls das radioaktive, aber pharmakologisch inaktive Produkt aus Fraktionen 26 - 30 (Peak 2). Die Fraktionen 20 - 24 (Peak 1) sind in diesem Reinigungsstadium noch heterogen. Man erkennt mehrere, z.T. spindelförmige und ineinander verlaufende Flecken im R_f-Bereich 0.45 - 0.61. Der Peak 1 umfaßt 16 %, der Peak 2 6% und der Iodidpeak 64 % der eingesetzten Radioaktivität. Der Rest der Radioaktivität verbleibt auf der Säule.

Abb. 5 Autoradiographie der DC-Trennung einzelner Fraktionen der Gelfiltration (s. Abbildung 4).
Die Auftrennung von je 1 µl der Fraktionen erfolgt an Kieselgel mit n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (3:20:6:24).

4.1.2.2. Affinitätsreinigung von ^{125}I-Palytoxin durch Bindung an Nierenmembranen

Die Heterogenität des Iodierungsproduktes, sowie seine geringe Bindbarkeit (nur ca. 2 % der eingesetzten Radioaktivität) machen eine weitergehende Reinigung erforderlich. Nach zahlreichen vergeblichen Versuchen mittels Gelfiltration, Ionenaustausch- und hydrophober Chromatographie erwies sich ein Affinitätsverfahren als geeignet. Ausgehend von der Hypothese, daß PTX mit der Na^+,K^+-ATPase reagiert, erfolgte die Reinigung über die Bindung an Nierenmembranen, welche besonders reich an diesem Enzym sind. Sie können in genügend großer Menge hergestellt werden und sind einfach handzuhaben.

Der Abbildung 6 entnimmt man etwa eine Verzehnfachung des spezifisch bindbaren Anteils der Radioaktivität durch die Affinitätsreinigung. Auch die Autoradiographie (Abbildung 7) nach DC-Trennung beweist den Erfolg dieses Reinigungsschrittes; jetzt ist ^{125}I-PTX in zwei verschiedenen Laufmitteln einheitlich.

Das nach der Gelfiltration noch vorhandene Iodid bzw. das unbekannte Nebenprodukt sind durch die Affinitätsreinigung fast vollständig entfernt. Natives und iodiertes PTX sind in beiden Laufmitteln nicht unterscheidbar. Ihre R_f-Werte sind 0.44 bei I (PTX nicht gezeigt) und 0.28 bei II (s. Abbildung 7).

Alle Bindungsstudien wurden ausschließlich mit affinitätsgereinigtem Material durchgeführt.

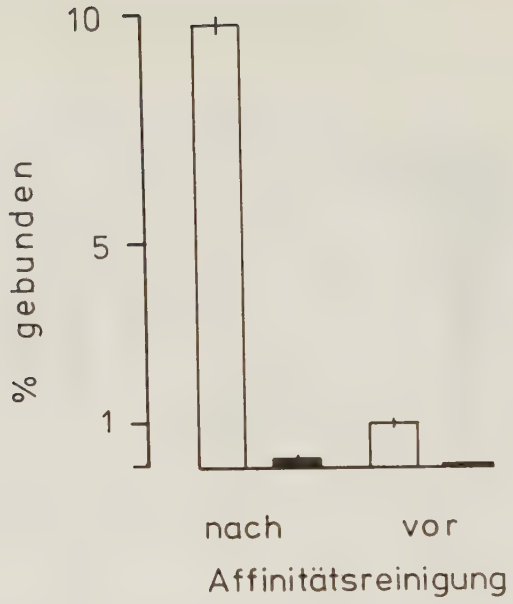

Abb. 6 Anteil der bindbaren Radioaktivität vor und nach der Affinitätsreinigung.

Die Bindung wurde gemessen unter Standardbedingungen (s. 3.5.1.1.) am Erythrozyten. Eingesetzt wurden jeweils 750 Bq der vereinigten Säuleneluate (Fraktion 1 der Abbildung 4) oder des Eluates aus Nierenmembranen. Eine fünffache Erhöhung der Erythrozytenkonzentration erbrachte keine nennenswerte Verbesserung der Bindung. Die schwarzen Balken geben die Bindung in Anwesenheit von 3 x 10^{-8} M PTX. Die Bindung wird in % der eingesetzten Radioaktivität angegeben.

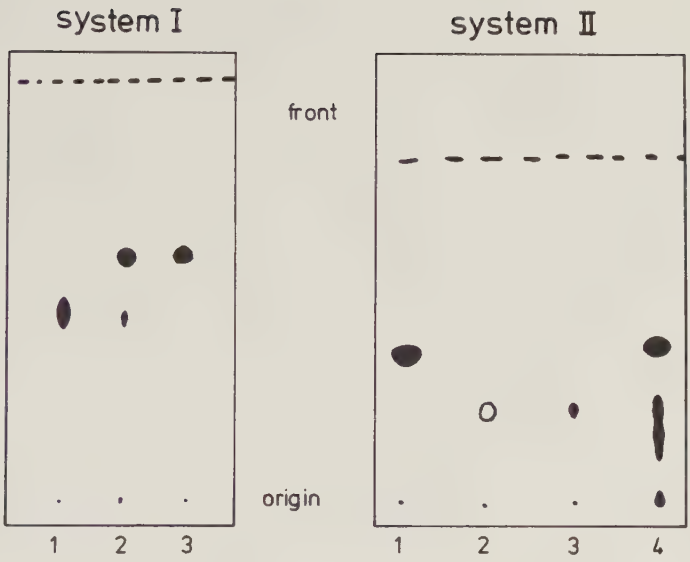

Abb. 7 Autoradiographie der unter 3.3.1. beschriebenen DC-Trennungen auf Kieselgel (I) und HPTLC-Platten (II) vor und nach der Affinitätsreinigung.

System I : 1 ^{125}I-PTX nach Affinitätsreinigung

2 Fraktion 1 der Gelfiltration

3 Na^{125}I

System II : 1 Na^{125}I

2 PTX (5 µg)

3 ^{125}I-PTX nach Affinitätsreinigung

4 Fraktion 1 der Gelfiltration

4.1.2.3. Bestimmung der spezifischen Radioaktivität

Um die Bindungs- und Kompetitionsversuche quantitativ auswerten zu können, ist die Kenntnis der spezifischen Radioaktivität des Tracers nötig. Da PTX aus verdünnten Lösungen mit gängigen Methoden, wie z.B. Histon/Pikrat oder Trichloressigsäure nicht fällbar ist, wird die spezifische Radioaktivität des Tracers mittels "self-displacement" bestimmt. Dabei wird vorausgesetzt, daß sich markiertes und unmarkiertes Toxin bei der Bindung gleich verhalten.

Ein repräsentatives Experiment zeigt Abbildung 8 A. Wie in 3.3.3.1. beschrieben wurde die IC_{50} von unmarkiertem PTX ermittelt. Anhand der Sättigung durch markiertes PTX läßt sich dessen Konzentration, bezogen auf die PTX-Eichkurve ermitteln, und hieraus wiederum die spezifische Radioaktivität (im gezeigten Versuch 465 Ci/mmol).

Um eine Aussage über die biologische Aktivität des Tracers nach der Affinitätsreinigung machen zu können, wurde der Kaliumaustritt aus Erythrozyten untersucht. Vergleicht man dann die EC_{50} von ^{125}I-PTX mit der des nativen Toxins (s. 3.3.3.2.), so kann man auch hieraus eine Angabe über die spezifische Radioaktivität erhalten. Diese bezieht sich dann auf die biologische Aktivität des Tracers. In Abbildung 8 B ist ein solcher Versuch dargestellt. Es errechnet sich eine spezifische Radioaktivität von 530 Ci/mmol.

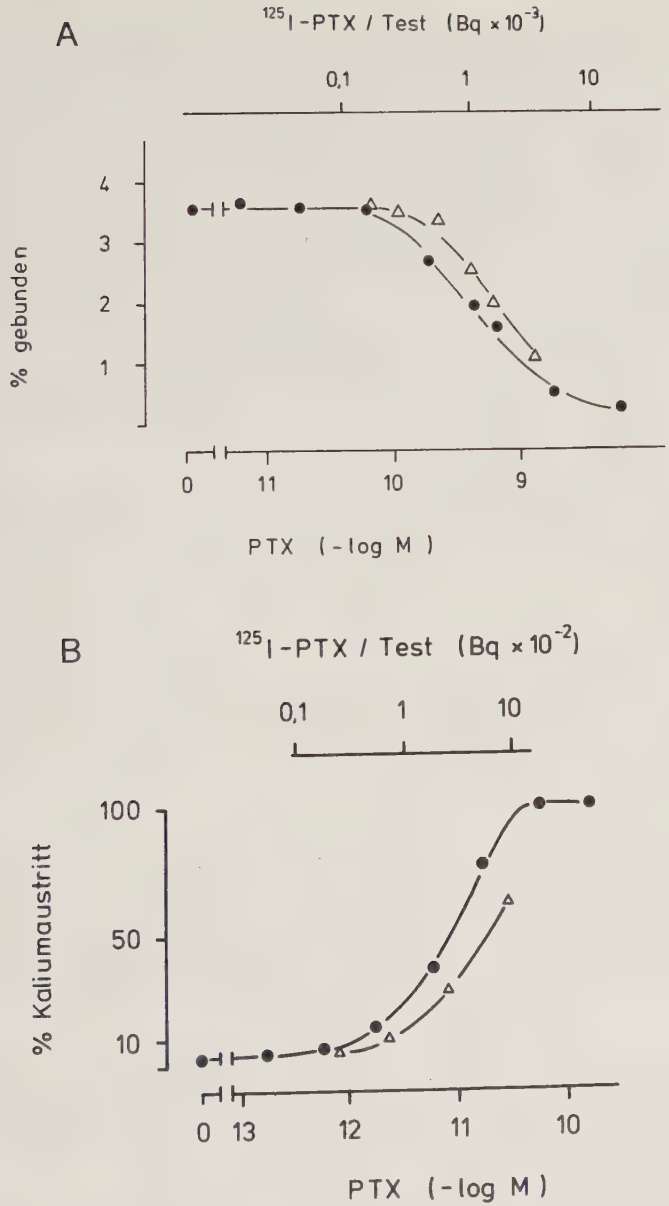

Abb. 8 Bestimmung der spezifischen Aktivität des affini-

tätsgereinigten Tracers.

A : Vergleich der Kompetition von nativem PTX (●) mit dem "self-displacement" von ^{125}I-PTX (△). Die Erythrozyten (0.3 %) werden unter Standardbedingungen (s. 3.3.3.1.) inkubiert. Bei der Kompetition mit PTX wurden 19 fmol ^{125}I-PTX je Ansatz eingesetzt. Die eingesetzte Radioaktivität bzw.PTX-Konzentration ist gegen die gebundene Radioaktivität (% der eingesetzten Radioaktivität) aufgetragen.

B : Kaliumaustritt am Erythrozyten bedingt durch ^{125}I-PTX (△) und natives PTX (●). Die Erythrozyten (1 %) werden unter Standardbedingungen (s. 3.3.3.2.) mit PTX bzw. ^{125}I-PTX inkubiert. Der Kaliumaustritt ist gegen die eingesetzte Radioaktivität bzw. PTX-Konzentration aufgetragen.

Die aus den Abbildungen 8 A und B ermittelten Werte liegen im selben Bereich. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß sich der Tracer zumindest in Bindung und Wirkung gleich verhält.

Aus einer Vielzahl solcher Bestimmungen ergibt sich eine mittlere spezifische Radioaktivität für den in dieser Arbeit verwendeten Tracer von 560 ± 186 Ci/mmol (n = 20).

4.1.2.4. Vergleich von Bindung und Wirkung

Bindung und Wirkung von ^{125}I-PTX können auch in einem einzigen Ansatz bestimmt werden. Aus diesem Versuchsansatz erhält man eine Aussage über die für die Wirkung nötige Besetzung der Rezeptoren. Wie aus Abbildung 9 ersichtlich, ergibt sich eine Verschiebung der Bindungs- gegenüber der Wirkungskurve um den Faktor 10 nach rechts.

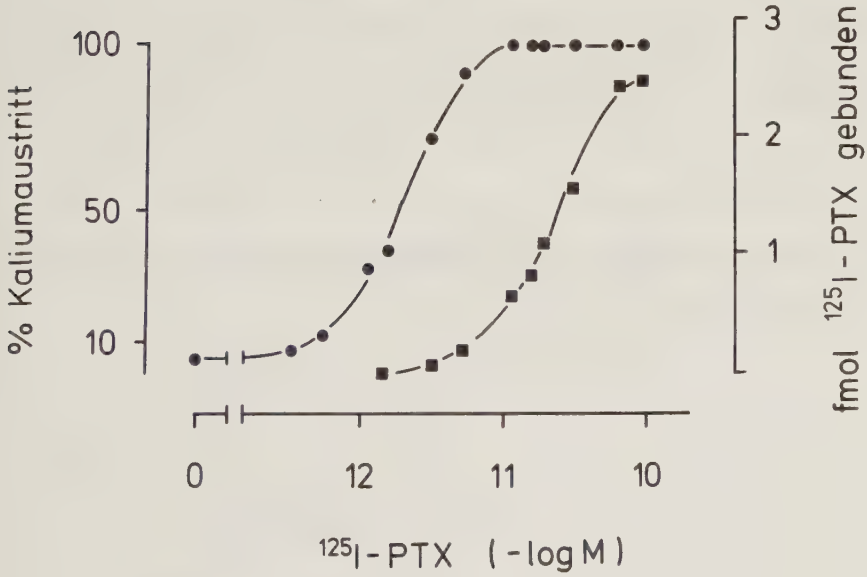

Abb. 9 Bindung (■) und Wirkung (●) von ^{125}I-PTX am Erythrozyten.

Die Erythrozyten wurden unter Standardbedingungen (s. 3.3.2.) für die Kaliumfreisetzung inkubiert. Nach Zentrifugation bei 3 000 x g wird im Überstand der Kaliumgehalt bestimmt. Das Pellet wird in 3 ml NHBC-alb (1 %) resuspendiert und wie in 3.5.1.1. weiterbehandelt. Die Konzentration an ^{125}I-PTX ist gegen die Bindung bzw. den Kaliumaustritt aufgetragen.

Es genügt bereits die Besetzung eines geringen Anteils der Rezeptoren um den Kaliumaustritt zu fördern. Dies paßt zu den Befunden von Ahnert-Hilger et al. (1982), daß bereits 15 Moleküle PTX pro Erythrozyt genügen, um 50 % seines Kaliums austreten zu lassen. Dabei wird die Hypothese angenommen, daß die Na^+,K^+-ATPase der Rezeptor für PTX ist. Da ungefähr 250 ATPasen-Moleküle je Erythrozyt vorhanden sind, genügt eine Rezeptorbesetzung von 5 - 10 %.

4.2. BINDUNGSCHARAKTERISTIKA AM ERYTHROZYTEN

Die Analyse der Bindungseigenschaften unseres ^{125}I-PTX Präparates diente drei Zielen. Zunächst war es erforderlich die optimalen Bindungsbedingungen bezüglich Zeit, Temperatur, pH-Wert usw. für spätere Versuche zu ermitteln. Zugleich dienten sie aber auch der Ermittlung der Qualität des Tracers; denn wenn seine Bindungseigenschaften gut mit der Wirkung des unmarkierten Toxins korrelierten, erhöhte dies die Wertigkeit der aus den Bindungsversuchen gezogenen Schlüsse. Schließlich eigneten sich die Bindungsstudien dazu, die Rolle der Na^+,K^+-ATPase als Rezeptor abzuklären.

4.2.1. Zeitabhängigkeit der Bindung am Erythrozyten

Das Ausmaß der Bindung bei einer konstanten Konzentration von ^{125}I-PTX wurde in Abhängigkeit von der Zeit untersucht (Abbildung 10).

Bereits fünf Minuten nach dem Beginn der Inkubation bei 37°C ist das Maximum der Bindung erreicht und bleibt über den betrachteten Zeitraum konstant. Als günstige Inkubationsdauer werden 30 Minuten gewählt, da die früheren Versuche zum Kaliumaustritt ebenfalls nach 30 Minuten abgestoppt wurden.

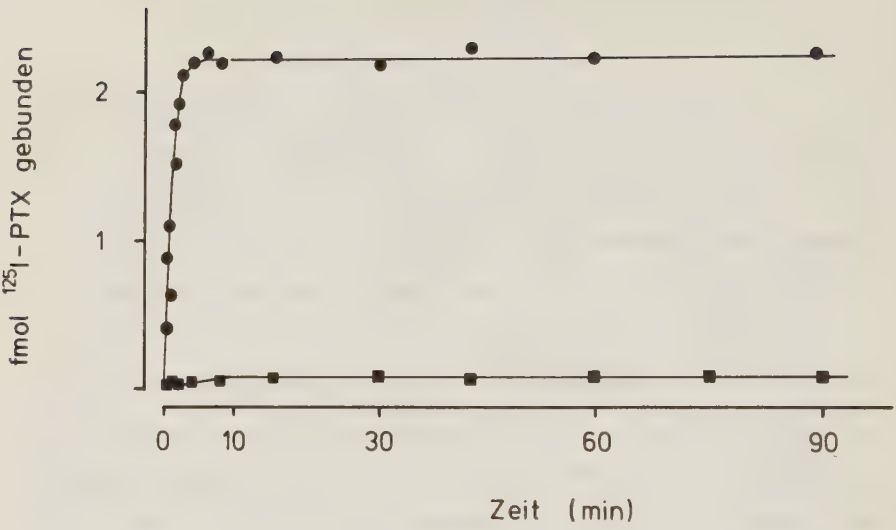

Abb. 10 Zeitabhängige Bindung von ^{125}I-PTX an Erythrozyten.

Die Bindung wurde unter Standardbedingungen (s. 3.5.1.1.) mit 27 fmol ^{125}I-PTX durchgeführt. Es sind die totale (●), sowie die unspezifische Bindung (■), d.h. die Bindung in Anwesenheit von 3×10^{-8} M PTX zeitabhängig dargestellt.

4.2.2. Temperaturabhängigkeit der Bindung am Erythrozyten

Verfolgt man bei verschiedenen Temperaturen die Bindung von ^{125}I-PTX an Erythrozyten, so erkennt man eine deutliche Temperaturabhängigkeit des Bindungsvorganges. Die Bindung hat bei 30°C ein Maximum (Abbildung 11 A).

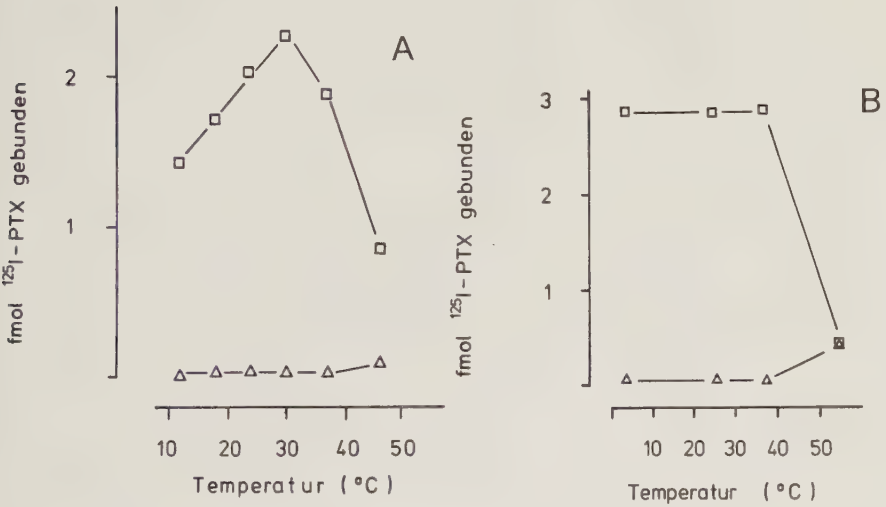

Abb. 11 Temperaturabhängigkeit der ^{125}I-PTX-Bindung am Erythrozyten.

A : Variation der Inkubationstemperatur im Bindungsversuch. Im Gegensatz zur totalen Bindung (□) mit ihrem Maximum bei 30°C hängt die unspezifische Bindung (△, gemessen in Anwesenheit von 3×10^{-8} M PTX) nicht von der Temperatur

ab. Es wurden 27 fmol ^{125}I-PTX je Ansatz zugegeben.

B : Vorinkubation der Erythrozyten bei der auf der Abszisse angegebenen Temperatur; dann wird mit PTX durchwegs bei 37°C das Bindungsassay durchgeführt. Das Bindungsvermögen für ^{125}I-PTX am Erythrozyten wird durch eine Vorinkubation von 60 Minuten bei 56°C, nicht aber bei 37°C geschädigt, wie die Bindung unter Standardbedingungen (s. 3.5.1.1.) ausweist. Es wurden 25 fmol ^{125}I-PTX eingesetzt und Symbole wie in A benutzt.

Die Abnahme der Bindung bei höherer Temperatur, z.B. 56°C (Abbildung 11 A) ist von einer Schädigung der Erythrozyten begleitet, denn es ist eine beginnende Hämolyse erkennbar. Infolgedessen mögen die Bindungsbedingungen, z.B. der intrazelluläre ATP-Gehalt (siehe 4.4.4.), durch vorheriges Erhitzen gestört sein. Eine einstündige Vorinkubation der Erythrozyten bis 37°C beeinflußt die spezifische Bindung nicht.

4.2.3. pH-Abhängigkeit der Bindung am Erythrozyten

Die Bestimmung der pH-Abhängigkeit der ^{125}I-PTX-Bindung wurde in Britton-Robinson-Puffer durchgeführt. Das Maximum der spezifischen Bindung liegt breit zwischen pH 6 und 7.5 (Abbildung 12).

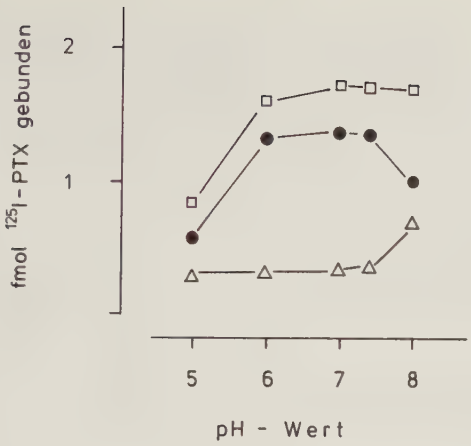

Abb. 12 Abhängigkeit der spezifischen Bindung von ^{125}I-PTX vom pH-Wert.
Standardbedingungen (s. 3.5.1.1.) aber in Britton-Robinson-Puffer von entsprechendem pH-Wert; mit 23 fmol ^{125}I-PTX pro Testansatz.
Totale (□), unspezifische (△) sowie spezifische (●) Bindung sind dargestellt.

4.2.4. Einfluß der Erythrozytenkonzentration auf die Bindung von ^{125}I-Palytoxin

Bei der Erhöhung der Erythrozytenkonzentration muß auch die Konzentration an PTX gesteigert werden, um zum gleichen EC_{50}-Wert für den Kaliumaustritt zu gelangen (Ahnert-Hilger et al., 1982); das weist auf eine stöchiometrische Beziehung

zwischen der Konzentration von PTX und Erythrozyten hin. Die Abbildung 13 zeigt das Bindungsverhalten von ^{125}I-PTX in Abhängigkeit von der Erythrozytenkonzentration.

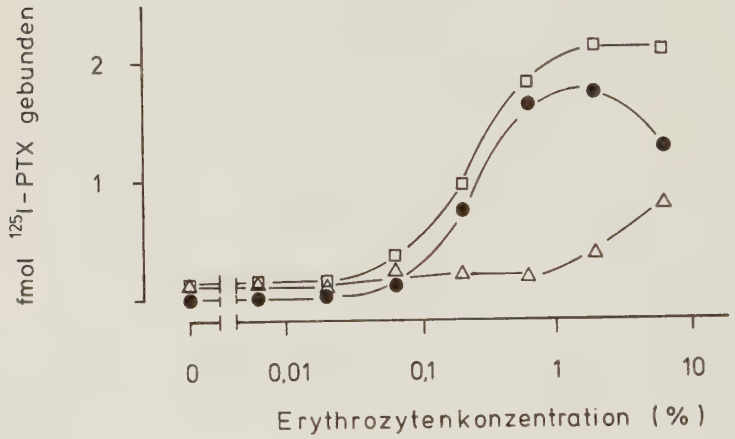

Abb. 13 ^{125}I-PTX wird in An- (△) und Abwesenheit (□) von 3 x 10^{-8} M PTX mit steigenden Konzentrationen an Erythrozyten bei 37°C inkubiert. Es resultiert hierbei ein Maximum der spezifischen Bindung (●). Jeder Testansatz enthielt 32 fmol ^{125}I-PTX. Die Abszisse gibt die Endkonzentration an Erythrozyten wieder.

Mit steigender Erythrozytenkonzentration steigt die Gesamtbindung bis zu einem Maximum, das bei etwa 2.2 von 32 fmol liegt. Die spezifische Bindung erreicht ein Maximum um 1.7 fmol und fällt dann wieder ab.

Das Resultat besagt :

a. Trotz Reinigung durch Affinität ist weniger als 10 % des radioaktiven Liganden an Erythrozyten bindungsfähig.

b. Neben der spezifischen, d.h. mit PTX sättigbaren Bindung, existiert eine unspezifische Bindung, die mit steigender Erythrozytenkonzentration deutlich wird. Sie wird übrigens auch an Erythrozytenmembranen beobachtet (siehe 4.3.1.).

c. Das Optimum der Erythrozytenkonzentration für Bindungsversuche mit ^{125}I-PTX liegt um 1 % und wurde entsprechend auch für die Standardbedingungen (s. 3.5.1.1.) gewählt.

Zusammenfassend gilt für die Wahl der Bindungsbedingungen, daß Zeit und pH-Wert nicht kritisch sind, während die Temperatur und die Erythrozytenkonzentration sorgfältig eingehalten werden müssen.

4.2.5. Untersuchungen zur Spezifität der Bindung

In der Folge soll Kompetition um die ^{125}I-PTX-Bindung sowie die Affinität der Derivate näher untersucht werden.

4.2.5.1. Bindungshemmung durch natives Palytoxin und Sättigbarkeit der Bindung

Inkubiert man Erythrozyten mit ^{125}I-PTX in Gegenwart von steigenden Konzentrationen an nativem PTX, so wird eine Kompetition erkennbar, die sich unter Voraussetzung gleicher

Affinitäten von markiertem und unmarkiertem PTX auch nach Scatchard umformen läßt (Abbildung 14).

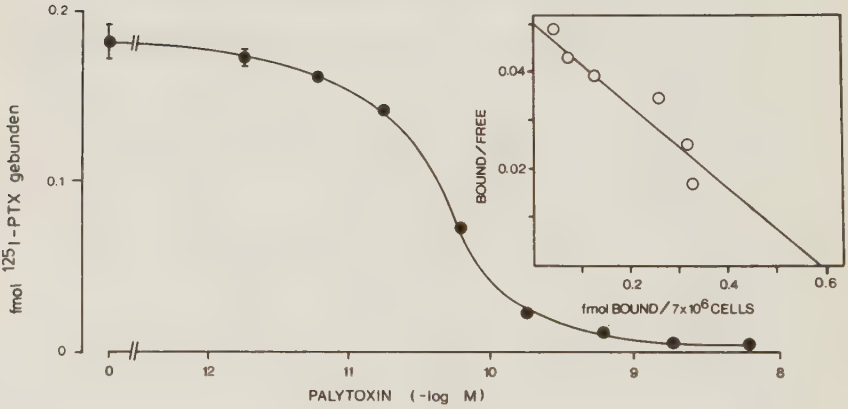

Abb. 14 Kompetition von ^{125}I-PTX mit nativem PTX unter Standardbedingungen (s. 3.5.1.1.). Das Inset zeigt die Scatchard-Analyse dieses Experimentes. Die Erythrozyten wurden mit 2.4 fmol ^{125}I-PTX inkubiert. Die Gesamtbindung betrug 0.31 fmol ohne Zusatz von nativem Toxin.

Über die Scatchard-Analyse dieses Kompetitionsexperimentes ergibt sich die Dissoziationskonstante zu 39 pM bei 86 Bindungsstellen pro Erythrozyt.

Die Inkubation von Erythrozyten mit steigenden Mengen an

^{125}I-PTX zeigt die Abbildung 15. Die spezifische Bindung ist sättigbar.

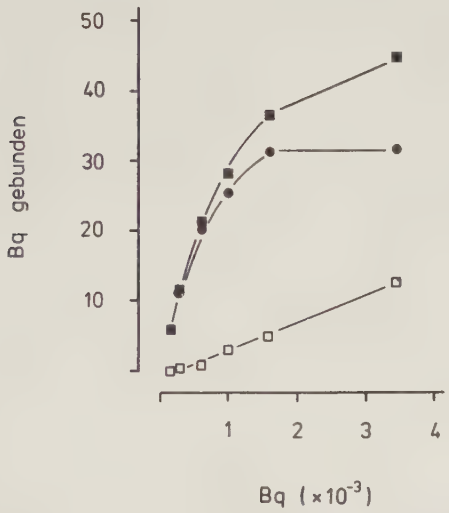

Abb. 15 Die Bindung von ^{125}I-PTX an Erythrozyten ist sättigbar.
Die spezifische (●), totale (■) und unspezifische (□) Bindung sind in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Radioaktivität dargestellt.

Aus acht unabhängigen Experimenten ergibt sich somit für die Dissoziationskonstante ein Wert von

$$3.97 \pm 1.50 \times 10^{-11} \text{ M.}$$

Es wurden 101 ± 24

Bindungsstellen pro Erythrozyt gefunden.

4.2.5.2. Reversibilität der ^{125}I-Palytoxin-Bindung

Die Dissoziation kann sowohl über ein Verdünnungsexperiment wie auch über die Zugabe von nativem Toxin bestimmt werden. In beiden Fällen werden identische Ergebnisse erhalten (Abbildung 16). Wie die Assoziation mit dem Rezeptor (s. 4.2.1.), so ist auch die Dissoziation vom Rezeptor ein schneller Prozeß.

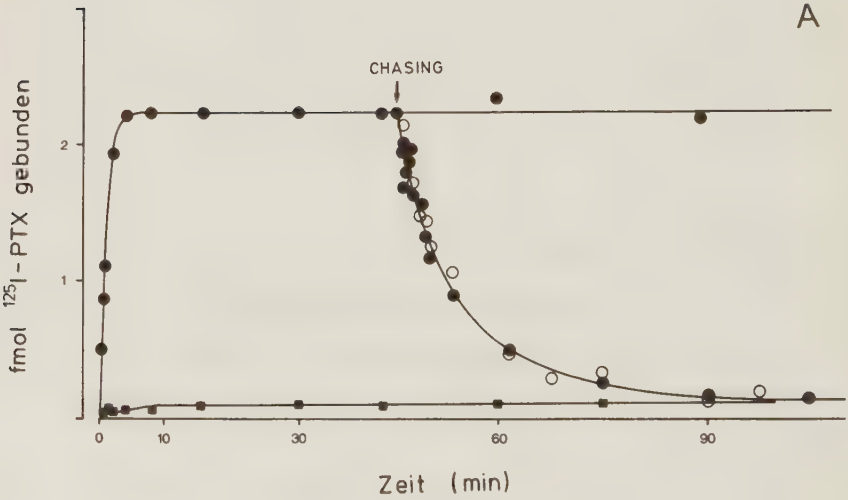

Abbildung 16A

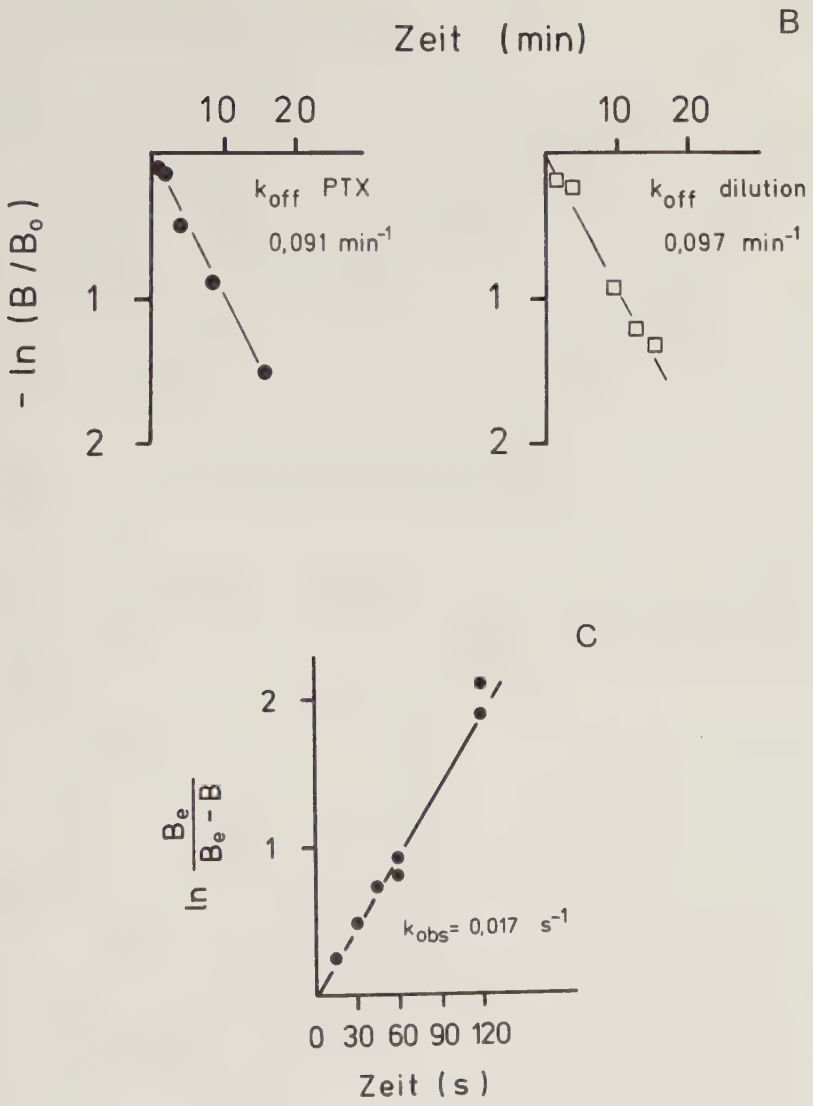

Abb. 16 Assoziation und Dissoziation von ^{125}I-PTX am intakten Erythrozyten.

A : Wiedergabe der experimentellen Daten. Man erkennt die hohe Geschwindigkeit der Assoziation. Auch die Dissoziation von ^{125}I-PTX von seiner Bindungsstelle ist schnell, unabhängig ob dies nach 50facher Verdünnung (○) oder nach Zusatz von 3×10^{-8} M nativem PTX (●) gemessen wird. Der Versuch wurde unter Standardbedingungen (s. 3.5.1.1.) mit 29 fmol ^{125}I-PTX durchgeführt.

B : Graphische Auswertung der off-Kinetiken nach der in 3.5.3.beschriebenen Methode.

C : Graphische Auswertung der on-Kinetik.

Wie in 3.5.3. hergeleitet, lassen sich aus den Daten die Geschindigkeitskonstanten, sowie die Dissoziationskonstante berechnen.

Man erhält : $k_{on} = 9.2 \times 10^{-3}\ min^{-1} \times pM^{-1}$

$k_{off} = 9.1 \times 10^{-2}\ min^{-1}$

$K_D = 9.8 \times 10^{-12}$ M

Dieser Wert für die Dissoziationskonstante liegt im gleichen Bereich wie der in 4.2.5.1. mittels der Equilibriumsmethodik erhaltene (3.97×10^{-11} M).

4.2.5.3. Untersuchungen zur Affinität von Palytoxinderivaten

Wie in 4.1.1. beschrieben verliert PTX bei der Derivatisierung der Aminogruppe an Wirksamkeit. Der Verlust an biologischer Aktivität geht mit einer Abnahme an Kompetitionsvermögen einher (Abbildung 17).

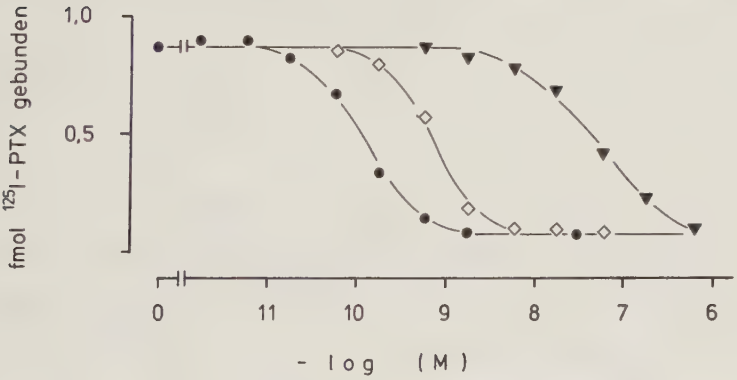

Abb. 17 Kompetition von ^{125}I-PTX mit nativem PTX (●), N-Acetyl-PTX (◇) und Dansyl-PTX (▼).
16 fmol ^{125}I-PTX wurden unter Standardbedingungen (s. 3.5.1.1.) mit PTX bzw. dessen Derivaten inkubiert.

Die Abnahme der biologischen Aktivität spiegelt sich wider in der deutlich schlechteren Fähigkeit mit ^{125}I-PTX um dessen Bindungsstelle am Erythrozyten zu konkurrieren (Tabelle 1).

4.2.6. Einfluß von Borat, Erdalkali- und Kaliumionen

Die Wirkungen von PTX werden durch das Vorhandensein von Ca^{2+} und Borat verstärkt (Ahnert-Hilger et al., 1982). Auch Nagase et al. (1984) fanden eine Verstärkung der Wirkung von PTX am Erythrozyten durch Ca^{2+}, Sr^{2+} und Ba^{2+}, als sie die Kaliumfreisetzung aus Kaninchenerythrozyten untersuchten. Es liegt daher nahe den Einfluß dieser Ionen auf die Bindung von ^{125}I-PTX am Erythrozyten zu untersuchen (Abbildung 18).

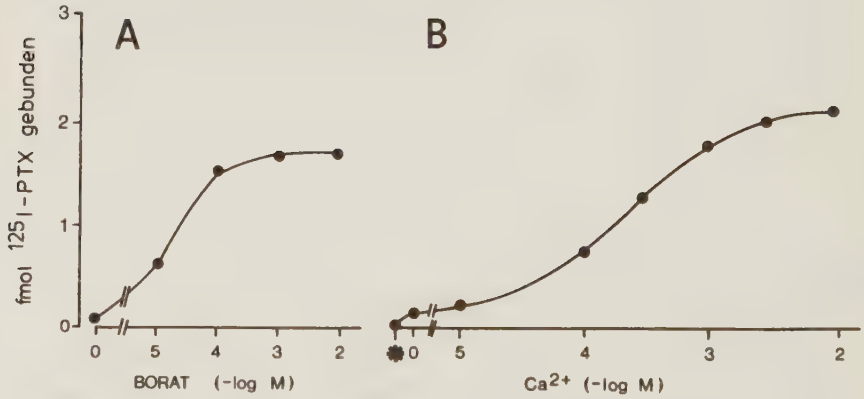

Abb. 18 Förderung der spezifischen Bindung von ^{125}I-PTX durch Borat (A) und Calciumionen (B).
Erythrozyten werden unter Standardbedingungen (s. 3.5.1.1.) mit 30 fmol ^{125}I-PTX inkubiert. In (A)

wird NHC, in (B) NHB als Puffer verwendet und die entsprechenden Konzentrationen an Borat bzw. Ca^{2+} aus Stammlösungen zugesetzt. Bei * wird 1 mM EGTA zugegeben um Ca^{2+} weitestgehend zu binden. Die Abszissen geben die Endkonzentrationen an Ionen wieder.

Beide Ionen fördern konzentrationsabhängig die spezifische Bindung von ^{125}I-PTX am Erythrozyten. Über die unspezifische Bindung in Gegenwart von Erdalkali-Ionen gibt Abbildung 19 Auskunft. Die unspezifische Bindung in Gegenwart von Borat geht z.B. aus Abbildung 16 A hervor. Bemerkenswert ist, daß ^{125}I-PTX ohne zugesetztes Ca^{2+} bindet, was aber mittels EGTA fast völlig unterdrückt wird (Abbildung 18 B). Also genügen bereits Spuren von Ca^{2+}, die bei der Arbeit mit Zellen stets im Medium zu erwarten sind, um eine Bindung von ^{125}I-PTX zu fördern.

Mit Strontium und Barium erreicht man den Effekt von Calcium nur partiell (Sr^{2+} 80 %, Ba^{2+} 24 %, bezogen auf die Bindung in Anwesenheit von Ca^{2+}). Magnesiumionen sind unwirksam, wie sie auch bezüglich der Förderung des Kaliumaustritts durch PTX ohne Effekt gewesen waren (Chhatwal et al., 1983).

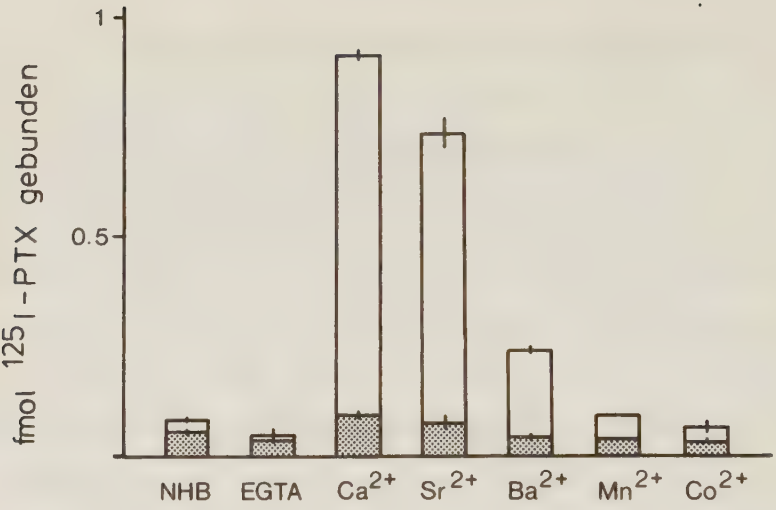

Abb. 19 Einfluß zweiwertiger Kationen auf die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung (dunkle Balken) von ^{125}I-PTX.
Die Endkonzentrationen aller getesteten Substanzen betrug 1 mM. Es wurden die Standardbedingungen (s. 3.5.1.1.) mit 13 fmol ^{125}I-PTX angewandt.

Kalium ist als hemmendes Ion bei der Hämolyse von Erythrozyten (Ahnert-Hilger et al., 1982) bekannt. Das dem Kalium nahestehende Rubidium hemmt den PTX-bedingten Kaliumaustritt aus menschlichen Erythrozyten (Ahnert-Hilger et al., 1982). Wir finden, daß auch die Bindung von ^{125}I-PTX Kalium-sensitiv ist (Abbildung 20). Der IC_{50}-Wert liegt bei 2.5 mM.

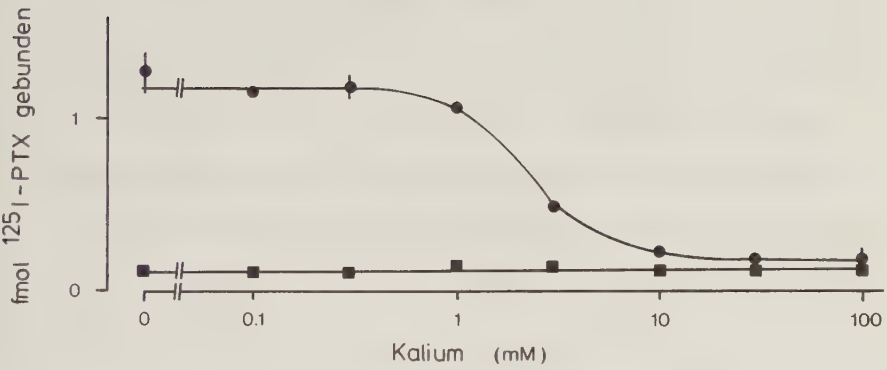

Abb. 20 Kalium hemmt die spezifische Bindung von ^{125}I-PTX an Erythrozyten konzentrationsabhängig.
Totale (●) und unspezifische (■) Bindung sind in Abhängigkeit von der Kaliumkonzentration dargestellt. 20 fmol ^{125}I-PTX wurden unter Standardbedingungen (s. 3.5.1.1.) eingesetzt.

4.3. B I N D U N G A N M E M B R A N E N

4.3.1. Bindung an Erythrozytenmembranen

Bindungsversuche an Erythrozyten weisen mehrere Probleme auf:

1. Die Konzentration der Erythrozyten, die in den Bindungsversuchen eingesetzt werden können ist beschränkt.
2. Die Bindung von ^{125}I-PTX könnte durch den Kaliumaustritt vermindert werden.

3. Die Bindungsstelle am intakten Erythrozyten befindet sich an der Grenze zwischen Zellinnerem und Umgebung. Die Zusammensetzung der beiden Kompartimente unterscheidet sich wesentlich. Inhaltsstoffe des Cytoplasmas könnten den Rezeptor beeinflussen.

Wir haben daher zunächst den Erythrozyten verschiedenen Veränderungen unterworfen (Tabelle 2), ehe wir uns der Arbeit mit Membranen zuwandten.

Tab. 2 Bindung von ^{125}I-PTX an Membranpräparationen nach Dodge (s. 3.4.3.), an IOV nach Lew (s. 3.4.4.) sowie an gefrorenen und wieder aufgetauten 1 %igen Erythrozytensuspensionen. Intakte Erythrozyten dienten als Vergleich. Die Konzentration an Membranprotein betrug 0.33 mg/ml. Ansonsten wurden Standardbedingungen (s. 3.5.1.1.) verwendet. Es wurden 19 fmol ^{125}I-PTX pro Ansatz eingesetzt. Die unspezifische Bindung wird in Anwesenheit von 3×10^{-8} M PTX bestimmt.

	^{125}I-PTX (FMOL)	
PRÄPARATION	GEBUNDEN	UNSPEZIFISCH GEBUNDEN
ZELLEN, INTAKT	0.83 ± 0.01	0.09 ± 0.03
MEMBRANEN NACH DODGE	0.69 ± 0.05	0.68 ± 0.02
ZELLEN, NACH GEFRIEREN	1.60 ± 0.06	1.55 ± 0.06
INSIDE-OUT VESIKEL	1.31 ± 0.15	1.39 ± 0.05

Unter gleichen Inkubationsbedingungen (Standardassay in NHBC) zeigt nur der intakte Erythrozyt eine spezifische Bindung. Die "Intaktheit" ist also für die spezifische Bindung von PTX und auch für die Zurückdrängung seiner unspezifischen Bindung essentiell. Die untersuchten Membranpräparationen weisen nur eine unspezifische Bindung auf. Um eine spezifische Bindung zu erhalten müssen also die Bedingungen verändert werden. Insbesondere muß ATP zugesetzt werden, wie unter 4.4.5. noch gezeigt wird.

4.3.2. Bindung an Nierenmembranen

Nierenmembranen sind besonders reich an Na^+,K^+-ATPase (Jorgensen, 1982), und wurden von uns zur Affinitätsreinigung von ^{125}I-PTX eingesetzt (s. 4.1.2.2.). Jetzt wurde versucht, die Membranen vom Erythrozyten durch solche von Nieren zu ersetzen.

Im Rahmen dieser Arbeit sind zunächst nahezu alle Bindungsparameter für ^{125}I-PTX an Nierenmembranen ermittelt worden. Das gilt z.B. für den Einfluß von Ionen, Temperatur, Zeit, pH-Wert. Von ihrer Wiedergabe wurde jedoch abgesehen, da die Versuche an Erythrozyten zu klareren Ergebnissen führten; vorteilhaft war insbesondere der wesentlich höhere Anteil spezifischer Bindung durch die intakte Zelle.

Die für den Erythrozyten erhaltenen Ergebnisse treffen aber im Prinzip auch auf die Nierenmembranen zu. Allerdings müssen drei Ausnahmen erwähnt werden :

1. Cardenolide kompetieren unter diesen Bedingungen nicht um die Bindungsstellen von ^{125}I-PTX. Das ist aber auf Grund der Versuche mit Nukleotiden an der Erythrozytenmembran verständlich (s. 4.4.5.).
2. Zur Verdrängung von ^{125}I-PTX sind höhere Konzentrationen an nativem PTX nötig (Abbildung 21).
3. Das Verhältnis zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung ist wesentlich ungünstiger als am Erythrozyten, indem nur ca. 60 % durch 6 x 10^{-7} M PTX verdrängbar sind.

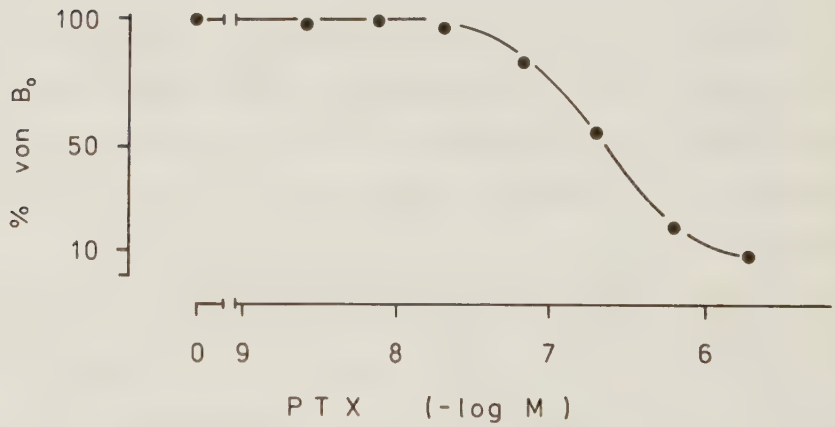

Abb. 21 Verdrängung von ^{125}I-PTX durch natives PTX an Nierenmembranen nach Jorgensen.
Die Membranen (0.33 mg/ml Protein) werden in NHB mit 10 fmol ^{125}I-PTX eingesetzt. Ohne Kompetitor (B_o) sind 0.23 fmol ^{125}I-PTX gebunden. Alle

Bindungswerte werden auf diese maximale Bindung B_o bezogen.

An Nierenmembranen ergibt sich ein IC_{50}-Wert für die Kompetition mit nativem Toxin von 2.5×10^{-7} M, während sie am Erythrozyten (s. 4.2.4.1.) bei etwa 4×10^{-11} M lag.

4.3.3. Bindung an Membranen aus verschiedenen Geweben

^{125}I-PTX bindet an alle untersuchten Membranpräparationen. Je höher die Na^+,K^+-ATPase-Aktivität der jeweiligen Präparation, desto höher ist auch der Anteil von spezifischer Bindung an der Gesamtbindung (Kompetition erfolgte hierbei mit 6×10^{-7} M PTX; s. Tabelle 3). Die sehr geringe ATPasen-Aktivität von Erythrozytenmembranen macht verständlich, weshalb keine spezifische Bindung erfaßbar war (s. 4.3.1.). Zusatz von ATP würde eine Bindung hervortreten lassen (s. 4.4.5.)

Membran	Spezies	ATPasen Aktivität (μmol x mg^{-1} x min^{-1})	^{125}I-PTX (fmol) gebunden	% Anteil der spezifischen Bindung
Niere (Jorgensen)	Schwein	1.76	2.5 $\pm$ 0.16	73.9
Gesamtniere	Ratte	0.54	1.18 $\pm$ 0.09	42.9
Hirn	Ratte	0.47	2.46 $\pm$ 0.12	39.2
Herz	Ratte	0.14	0.57 $\pm$ 0.03	28.5
Leber	Ratte	0.17	0.57 $\pm$ 0.02	28.2
Muskel	Ratte	0.09	0.27 $\pm$ 0.02	15.6
Erythrozyt	Mensch	0.01	0.32 $\pm$ 0.14	N.D.

Tab. 3 Vergleich zwischen Bindung von ^{125}I-PTX und spezifischer Aktivität der Na^+,K^+-ATPase verschiedener Membranen.
Der Bindungsversuch wurde in Tris-Borat mit 25 fmol ^{125}I-PTX in An- und Abwesenheit von 6 x 10^{-7} M PTX durchgeführt. Die Bestimmung der ATPasen-Aktivität ist in 3.6. beschrieben. Für die Bindung wurde jeweils eine Endkonzentration von 0.5 mg Protein/ml eingesetzt. Die spezifische Bindung wird auf die jeweilige Totalbindung (fmol/Ansatz) bezogen.

4.4. BEZIEHUNGEN ZUR Na^+, K^+-ATPASE

Ergebnisse aus der Literatur lassen eine Wechselwirkung zwischen PTX und der Na^+,K^+-ATPase vermuten.

Dafür spricht :

1. Der PTX-bedingte Kaliumaustritt am Erythrozyten ist durch Ouabain hemmbar (Habermann und Chhatwal, 1982).
2. PTX kompetiert mit ^{3}H-Ouabain um Bindungsstellen an Erythrozytenmembranen (Habermann und Chhatwal, 1982).

Dazu kommen einige unserer Resultate :

1. Die spezifische Bindung von ^{125}I-PTX ist vom Vorhandensein der Na^+,K^+-ATPase abhängig (4.3.3.).
2. Die Bindung von ^{125}I-PTX wird durch Kalium gehemmt (siehe 4.2.6.).

Im Folgenden soll diese Hypothese geprüft werden.

4.4.1. Einfluß von Cardenoliden auf den PTX-bedingten Kaliumaustritt

Ouabain hemmt den PTX-bedingten Kaliumaustritt aus Erythrozyten (Habermann und Chhatwal, 1982). Ozaki et al. (1984a) fanden, daß nur Glykoside, nicht aber deren Aglykone den PTX-bedingten Kaliumaustritt am Kaninchen-Erythrozyten hemmten. Das von dieser Arbeitsgruppe benutzte Puffersystem

war boratfrei und daher auch die EC_{50} für PTX ungefähr 500fach höher als die von uns gefundene EC_{50} an menschlichen Erythrozyten. Wir untersuchten zunächst die Wirkungen der Cardenolide auf den PTX-bedingten Kaliumaustritt in unserem System.

Aus Tabelle 4 wird deutlich, daß die Glykoside viel stärker als die entsprechenden Aglykone die PTX-Wirkung hemmen. Die Aglykone sind aber nicht unwirksam.

Tab. 4 Einfluß verschiedener Herzglykoside bzw. deren Aglykone (jeweils 10^{-5} M Endkonzentration) auf den Kaliumaustritt aus Erythrozyten. Die Vorinkubation (60 Minuten) der Erythrozytensuspension mit diesen Substanzen erhöht deren Hemmwirkung.

	EC_{50} (M) FÜR PTX	
SUBSTANZ	OHNE VORINKUBATION	MIT VORINKUBATION
PTX	1.4×10^{-12}	1.7×10^{-12}
OUABAGENIN	2.1×10^{-12}	2.8×10^{-12}
DIGITOXIGENIN	7.8×10^{-12}	2.1×10^{-11}
OUABAIN	2.8×10^{-11}	2.8×10^{-10}
DIGITOXIN	3.7×10^{-11}	3.2×10^{-10}

Diese Zusammenstellung zeigt auch, daß eine Vorinkubation der Erythrozyten mit den Cardenoliden die Konzentrations-Wirkungskurven nach rechts verschiebt. Der Grund ist in der langsamen Assoziationskinetik der Cardenolide mit ihrem Rezeptor zu suchen (Erdmann, 1982).

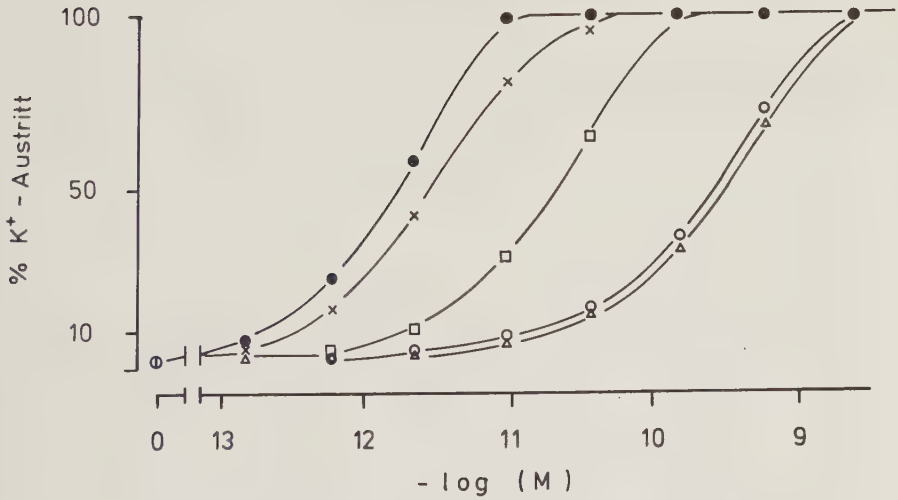

Abb. 22 Cardenolide verschieben die Konzentrations-Wirkungskurve von PTX nach rechts.
Erythrozyten wurden 60 Minuten mit Puffer (●), Ouabain (○), Ouabagenin (×), Digitoxin (△) und Digitoxigenin (□) bei 37°C vorinkubiert und dann zu den entsprechenden Konzentrationen an PTX gegeben. Die Endkonzentration aller zugefügten

Inhibitoren beträgt 10^{-5} M. Der Kaliumaustritt wird unter Standardbedingungen (s. 3.2.2.) bestimmt.

4.4.2. Hemmung der ^{125}I-Palytoxin-Bindung durch Cardenolide

Cardenolide hemmen die Wirkungen von PTX am Erythrozyten (Habermann et al., 1981; Ozaki et al., 1984a; s. auch 4.4.1.) und an der glatten Muskulatur (Ishida et al., 1985). Umgekehrt vermag PTX die Bindung von ^{3}H-Ouabain an Erythrozytenmembranen mit einer K_i von 1.8×10^{-8} M zu hemmen (Habermann und Chhatwal, 1982).

Daher wird hier die Kompetition von ^{125}I-PTX mit Ouabain bzw.Ouabagenin im Vergleich zu PTX untersucht (Abbildung 23). Sowohl die Glykoside als auch die Aglykone konkurrieren mit ^{125}I-PTX um dessen Bindungsstelle am Erythrozyten, letztere aber viel schwächer. Immer sind sehr viel höhere Konzentrationen als bei nativem Toxin nötig.Die Tabelle 5 vergleicht die nach Cheng und Prusoff (1973) errechneten K_i-Werte verschiedener Cardenolide.

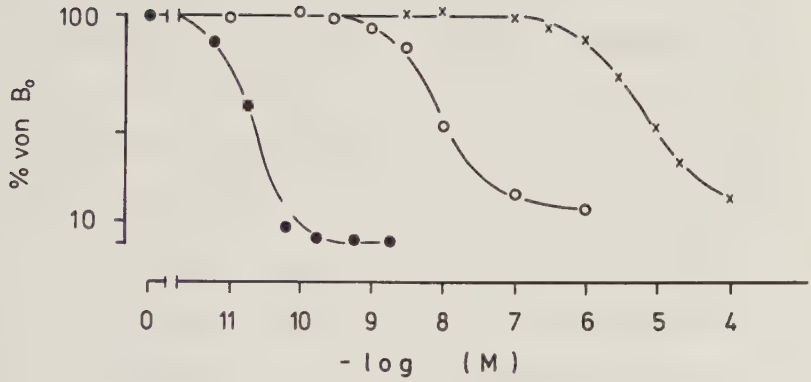

Abb. 23 Kompetition von ^{125}I-PTX mit PTX (●), Ouabagenin (✕) und Ouabain (○) um Bindungsstellen am intakten Erythrozyten.

Die Erythrozyten wurden mit den Kompetitoren 60 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Ohne Kompetitor (B_o) sind 0.33 fmol von 11 fmol eingesetztem ^{125}I-PTX gebunden. Die Bindung in Anwesenheit von Kompetitoren ist als % dieser Bindung B_o aufgetragen. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen (s. 3.5.1.1.).

Tab. 5 K_i-Werte verschiedener Cardenolide und K_D von PTX für die Bindung von ^{125}I-PTX. Es wurden identische Bedingungen wie in Abbildung 23 gewählt.

SUBSTANZ	K_I BZW. K_D IN M
PTX	7.6×10^{-11}
OUABAIN	3×10^{-9}
DIGITOXIN	3×10^{-9}
OUABAGENIN	6×10^{-5}
DIGITOXIGENIN	8.5×10^{-8}

Bei dem in Tabelle 5 wiedergegebenen Versuch wurden die Erythrozyten mit den Liganden für eine Stunde vorinkubiert. Das war wegen der langsamen Assoziation der Cardenolide mit ihrem Rezeptor erforderlich.

4.4.3. Kompetition zwischen Palytoxin und ^{3}H-Ouabain

Die ATPase ist der Rezeptor für alle Herzglykoside (Akera, 1981; Erdmann, 1981; Anner, 1985).

Bereits seit einigen Jahren (Habermann et al., 1981b) ist bekannt, daß PTX mit ^{3}H-Ouabain um Bindungsstellen an der Erythrozytenmembran kompetiert. Allerdings ist die K_i mit 1.8×10^{-8} M etwa 10 000fach höher, als die für den Kaliumaustritt benötigte Konzentration (IC_{50} um 10^{-12} M). Es muß aber betont werden, daß diese Versuche an Erythrozytenmembranen durchgeführt wurden. Nachdem wir jetzt wissen, daß die Bindungscharakteristika an intakten Zellen sich quantitativ ganz erheblich von der mit Membranen erfaßten unterscheiden, war es erforderlich die Wechselwirkungen von PTX mit ^{3}H-Ouabain erneut zu untersuchen, diesmal an intakten Erythrozyten.

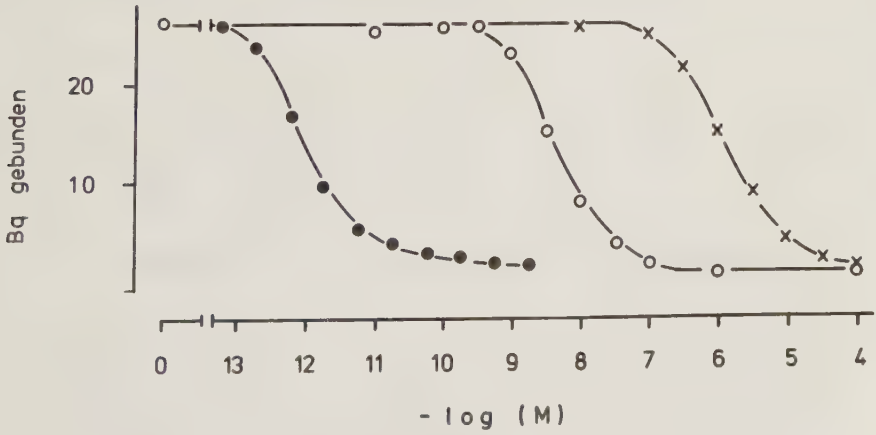

Abb. 24 PTX kompetiert mit ^{3}H-Ouabain um dessen Bindungs-

stelle am intakten Erythrozyten stärker als Ouabain und Ouabagenin.

PTX (●), Ouabain (○) und Ouabagenin (X) werden mit 230 fmol ^{3}H-Ouabain und einer 10 %igen Erythrozytensuspension 4.5 Stunden bei 37°C inkubiert.

Im Unterschied zur ^{125}I-PTX-Bindung muß wegen der anderen Assoziationskinetik von ^{3}H-Ouabain die Inkubationsdauer auf 4.5 Stunden ausgedehnt und die Erythrozytenkonzentration wegen der niedrigeren spezifischen Radioaktivität verzehnfacht werden. Tabelle 6 faßt die Ergebnisse der Abbildung 24 zusammen.

Tab. 6 IC_{50}-Werte sowie K_D (für Ouabain) und K_i (für Ouabagenin und PTX) bei der Kompetition mit ^{3}H-Ouabain (berechnet aus Abbildung 24).

Die K_D ergibt sich aus der Scatchard-Analyse, K_i nach der Berechnung von Cheng und Prusoff (1973).

SUBSTANZ	IC_{50} (M)	K_D BZW. K_I (M)
OUABAIN	4.3×10^{-9}	2.9×10^{-9}
OUABAGENIN	1.4×10^{-6}	1.1×10^{-6}
PTX	9.5×10^{-13}	7.5×10^{-11}

Ouabain pro Erythrozyt errechnet, was den von Erdmann (1982) angegebenen Werten entspricht. PTX hemmt am intakten Erythrozyten die ^{3}H-Ouabain-Bindung etwa 5 000 mal stärker als Ouabain selbst und ist damit der mit Abstand potenteste Ligand für die Na^{+},K^{+}-ATPase.

4.4.4. Bindung an ATP-verarmte Erythrozyten

Durch die Inkubation der Erythrozyten in Depletionsmedium verarmen sie an intrazellulärem ATP. Der ATP-Gehalt liegt dann unter 0.5 uM und geht mit einem Verlust an Wirksamkeit von PTX einher (Habermann und Chhatwal, 1982).
Tabelle 7 gibt Auskunft über die Bindung von ^{3}H-Ouabain und ^{125}I-PTX an derart behandelte Erythrozyten.

Tab. 7 Minderung der spezifischen Bindung von ^{3}H-Ouabain und ^{125}I-PTX durch ATP-Depletion von Erythrozyten. Es wurden 210 fmol ^{3}H-Ouabain mit 10 % Erythrozyten bzw. 16 fmol ^{125}I-PTX mit 1 % Erythrozyten 4.5 Stunden bei 37°C inkubiert. An frisch gewaschene Erythrozyten banden 8.5 fmol ^{3}H-Ouabain bzw. 0.53 fmol ^{125}I-PTX spezifisch. Auf diese Werte werden alle anderen Daten bezogen. Die unspezifische Bindung wird in Anwesenheit von 10^{-4}

M Ouabain bzw. 3×10^{-8} M PTX bestimmt. Sie bleibt auch bei Depletion konstant.

Vorbehandlung	^{3}H-Ouabain % spez. Bindung	^{125}I-PTX % spez. Bindung
Frische Erythrozyten	100	100
Kontroll-Ansatz	81	77
Depletierte Erythrozyten	17	1

Die spezifische Bindung für beide Tracer sinkt bei ATP-Depletion, d.h. es ist ATP zum Erhalt der spezifischen Bindung an Erythrozyten notwendig.

4.4.5. Einfluß von Nukleotiden auf die Bindung von ^{125}I-Palytoxin und ^{3}H-Ouabain an Erythrozytenmembranen

Nach 4.4.4. ist die Bindung von ^{125}I-PTX an intakte Erythrozyten ATP-abhängig. Das gilt auch für die Wirkung von PTX (Habermann und Chhatwal, 1982). Es liegt deshalb nahe den Einfluß von Nukleotiden auf die Bindung zu untersuchen.

Dazu werden Erythrozytenmembranen nach Dodge et al. (1963) verwendet. Da eine Förderung der Ouabain-Bindung an Membranen durch Mg^{2+} und P_i bekannt ist (Schuurmans Stekhoven und Bonting, 1981), wurden diese Reagentien in das Programm eingeschlossen.

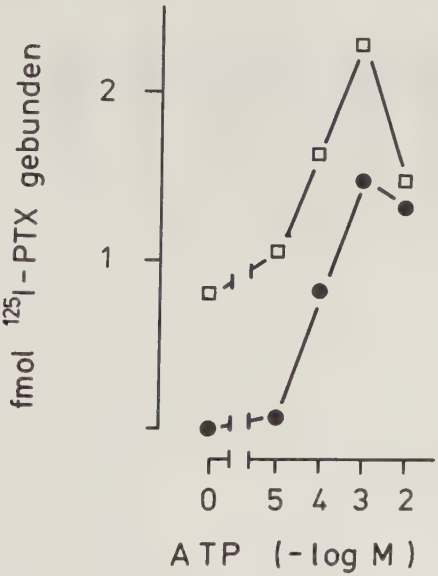

Abb. 25 ATP fördert konzentrationsabhängig die spezifische Bindung von ^{125}I-PTX an Erythrozytenmembranen.

In Abhängigkeit von der externen ATP-Konzentration (Abszisse) sind die Gesamtbindung (□) und die spezifische Bindung (●) dargestellt nach Inkubation unter Standardbedingungen (s. 3.5.1.1.). Jeder Bindungsansatz enthielt 24 fmol ^{125}I-PTX und 0.1 mg Membranprotein.

Erythrozytenmembranen eignen sich weniger als intakte Erythrozyten für Bindungsversuche, weil - wie bei anderen Membranpräparationen (s. Tabelle 3) - die unspezifische Bindung wesentlich höher ist. Während sie am Erythrozyten nur etwa 5 % der totalen Bindung beträgt, liegt sie hier, selbst unter optimalen Aktivierungsbedingungen, bei etwa 40 % (Abbildung 25).

In Abwesenheit von ATP fehlt die spezifische Bindung des Tracers. Sie wird rekonstituiert mit einem Optimum bei etwa 10^{-3} M des Nukleotids.

Auch andere energiereiche Nukleotide fördern die Bindung an Erythrozytenmembranen (Abbildung 26).

Neben ATP fördert auch ADP die Bindung von ^{125}I-PTX. Dies ist verständlich, weil ADP entsprechend der enzymkatalysierten Reaktion $2\ ADP \rightleftharpoons ATP + AMP$ als Vorstufe von ATP zu betrachten ist. Auch GTP fördert die Bindung von PTX, wenn auch schwächer als ATP.

Die Förderung der Bindung von Ouabain läßt die gleiche Reihung fördernder Nukleotide erkennen. Als Besonderheit ist zu vermerken, daß die bekannte Begünstigung der Ouabain-Bindung durch die Kombination von Magnesium und Phosphat (Akera, 1977) bei PTX nicht erkennbar ist.

Chhatwal et al. (1983) haben Erythrozytenschatten mit den hier genannten Nukleotiden gefüllt und wieder verschlossen, ehe sie PTX darauf wirken ließen und den Kaliumaustritt bestimmten. Die Reihung der Nukleotide bezüglich Förderung der PTX-Wirkung war dieselbe wie die jetzt gefundene

Anordnung bezüglich der PTX-Bindung.

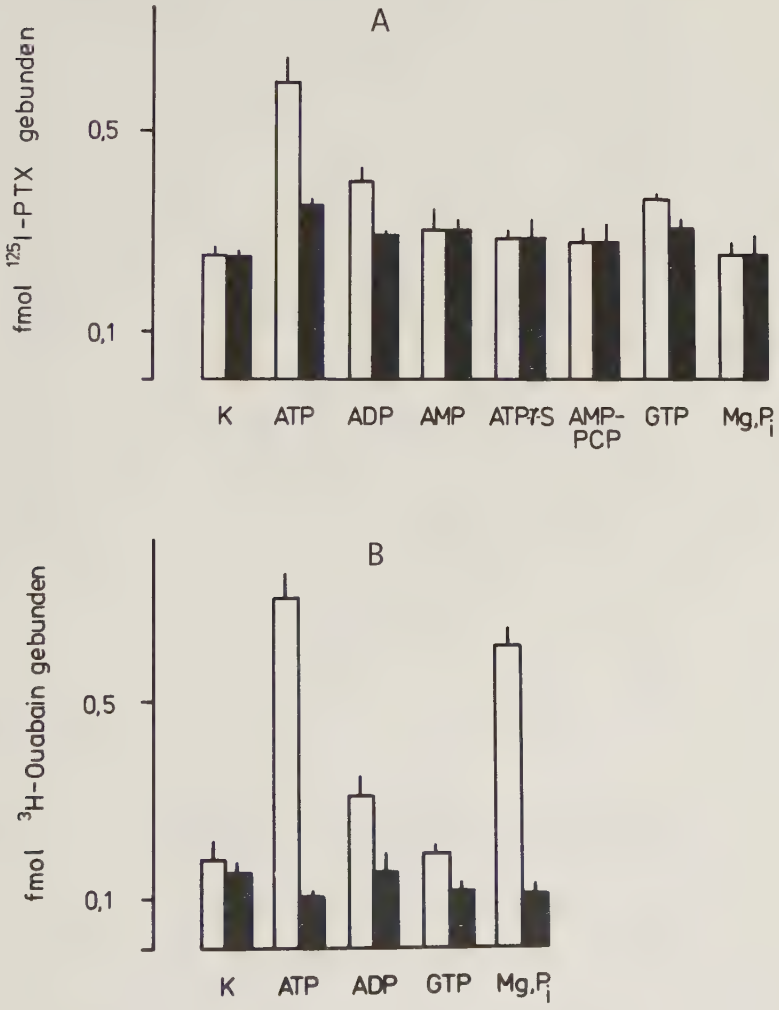

Abb. 26 Einfluß von Nukleotiden, Mg^{2+} und P_i auf die Bindung von ^{125}I-PTX (A) und ^{3}H-Ouabain (B) an Erythrozytenmembranen.

Um den Einfluß der Nukleotide auf die Bindung zu prüfen, wird in NHBC als Inkubationspuffer gearbeitet. Bei den Untersuchungen mit Mg^{2+} und P_i wird Tris-Borat (s.3.1.) verwendet, weil Na^+ die Förderung der Bindung durch Mg^{2+} und P_i unterdrückt (Jorgensen, 1983). Es sind identische Bedingungen wie in Tabelle 7 für Tracermengen und Inkubationszeit gewählt (um gleiche Bedingungen zu erhalten wurde auch bei ^{125}I-PTX 4.5 Stunden inkubiert). 0.25 fmol ^{125}I-PTX und 0.6 fmol ^{3}H-Ouabain wurden spezifisch gebunden. Gesamtbindung (weiße Balken) und Bindung in Anwesenheit von 3 x 10^{-8} M PTX bzw. 10^{-4} M Ouabain (schwarze Balken) sind abgebildet. Beim Kontrollansatz (K) ist die Bindung in NHBC an die Membranen aufgetragen.

4.4.6. ^{125}I-Palytoxin und der Hundeerythrozyt

Es ist eine Kuriosität der Erythrozyten des Hundes, daß sie außerordentlich arm an Na^+,K^+-ATPase sind und daher der für andere Zellen geläufige Na^+,K^+-Gradient bei ihnen fehlt (Chan et al., 1964; Maede und Inaba, 1985). Durch Habermann und Chhatwal (1982) wissen wir, daß die sehr kleine Kalium-Menge aus Erythrozyten des Hundes selbst dann nicht austritt, wenn man ihn gegen 10^{-6} M PTX exponiert. Wir

verglichen jetzt die Bindung von ^{125}I-PTX an Erythrozyten des Hundes und des Menschen (Abbildung 27).

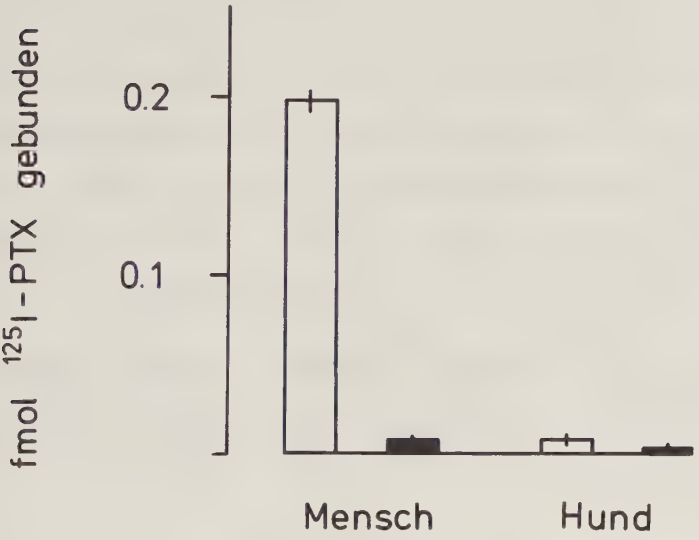

Abb. 27 Bindung von ^{125}I-PTX an Erythrozyten des Menschen und des Hundes.
Die Bindung wird unter Standardbedingungen (s. 3.5.1.1.) untersucht. Gesamtbindung (weiße Balken) und Bindung in Anwesenheit von 3×10^{-8} M PTX (schwarze Balken) sind abgebildet.

Der Hundeerythrozyt bindet also ^{125}I-PTX nicht meßbar in verdrängbarer Weise. Nun wollten wir wissen, ob der Hundeerythrozyt unspezifische Bindungsstellen besitzt, die durch Membranpräparation freigelegt werden. Daher

verwendeten wir Membranen nach Dodge et al. (1963) aus diesen Zellen.

Tab. 8 Bindung von ^{125}I-PTX an Erythrozytenmembranen des Menschen und des Hundes.
Es ist die Bindung in An- und Abwesenheit von 1 mM ATP und/oder 3 x 10^{-8} M PTX zusammengestellt. Die Bindung ist in fmol ^{125}I-PTX angegeben. Jeder Testansatz enthielt 21 fmol ^{125}I-PTX und 0.1 mg Protei

	^{125}I-PTX (FMOL) GEBUNDEN			
	MENSCH		HUND	
ATP	ANWESEND	ABWESEND	ANWESEND	ABWESEND
GESAMTBINDUNG	2.30 ± 0.13	0.89 ± 0.0	2.29 ± 0.07	2.29 ± 0.13
UNSPEZIFISCHE BINDUNG	0.85 ± 0.05	0.83 ± 0.02	2.28 ± 0.13	2.30 ± 0.09

Jetzt findet man eine unspezifische Bindung, die etwa derjenigen der Gesamtbindung (in Anwesenheit von ATP) am menschlichen Erythrozyten entspricht. Dies entspricht den Ergebnissen von Habermann (1983), der mit einem biologischen Test herausfand, daß Dodge-Membranen aus Hundeerythrozyten PTX binden können. Beide Untersuchungen führen also zu dem gleichen Ergebnis, daß ^{125}I-PTX an diese Membranpräparation bindet, aber eine Kompetition mit nativem Toxin nicht stattfindet. Zugleich darf geschlossen werden, daß die "unspezifischen" Bindungsstellen, welche durch Membranpräparation freigelegt werden, für die Wirkung von PTX irrelevant sind.

4.4.7. Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch Palytoxin

Bereits Garcia-Castineira et al.(1977a,b) fanden eine Hemmung der Na^+,K^+-ATPasen Aktivität durch Palythoa-Extrakte. Dieser Effekt wurde aber in der zweiten Publikation dem mitextrahierten Serotonin zugeschrieben. Auch Habermann und Chhatwal (1982) beobachteten zunächst keine Hemmung der ATPase durch gereinigtes PTX, obwohl PTX die Bindung von ^3H-Ouabain an Erythrozytenmembranen hemmte.
Unter Veränderung der damaligen Versuchsbedingungen, d.h. Erhöhung der PTX-Konzentration bei gleichzeitiger Erniedrigung der Membrankonzentration, wiesen wir aber eine Hemmung der Na^+,K^+-ATPase nach (Abbildung 28).

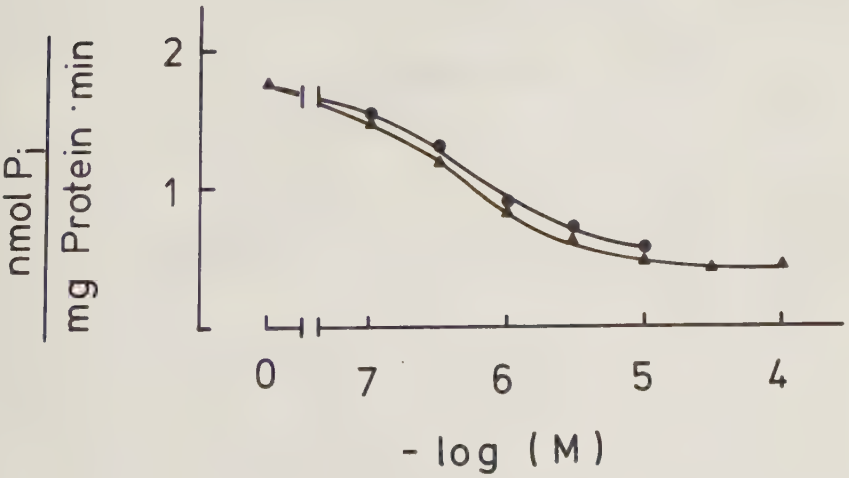

Abb. 28 Hemmung der Na^+,K^+-ATPase isolierter (Dodge) Erythrozytenmembranen durch PTX und Ouabain.

Aufschluß mit SDS und Bedingungen der Inkubation wie in 3.6. beschrieben. Die Endkonzentration an Membranprotein war 60 µg/ml und die Inkubation mit ATP dauerte 90 Minuten. In Anwesenheit von 0.5 mM Borat hemmt PTX (●) die ATPase im gleichen Konzentrationsbereich wie Ouabain (▲).

Die halbmaximale Hemmung liegt bei 5.5×10^{-7} M PTX; damit ist PTX etwa gleich wirksam wie Ouabain (4×10^{-7} M). Nierenmembranen müssen im Gegensatz zu Erythrozytenmembranen nach Forbush (1983) mit SDS behandelt werden, um das normalerweise in dichten rightside-out Vesikeln eingeschlossene aktive Zentrum der ATPase freizulegen. Diese renale Na^+,K^+-ATPase wird gleichfalls durch PTX gehemmt (Abbildung 29).

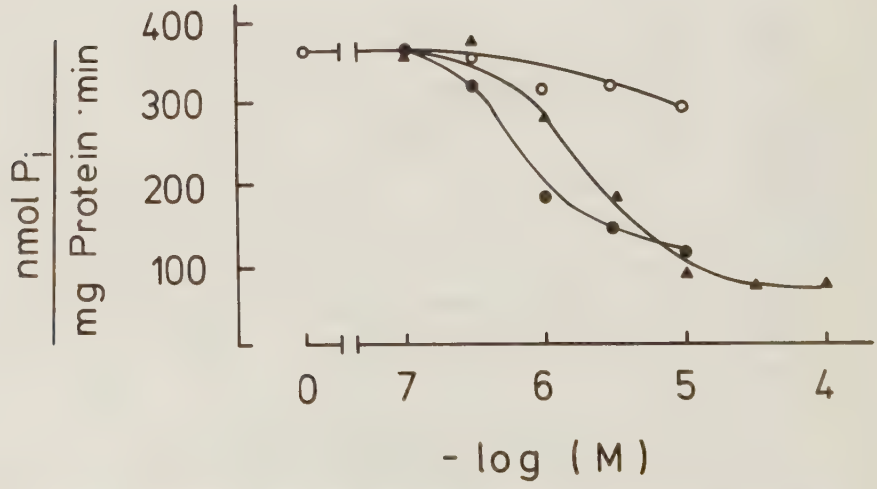

Abb. 29 Hemmung der Na^+,K^+-ATPase aus Nierenmembranen durch PTX und Ouabain.

Mit SDS aktivierte Nierenmembranen (s. 3.6.1., Endkonzentration 2.5 ug/ml) werden in Anwesenheit (geschlossene Symbole) und Abwesenheit (offene Symbole) von 0.5 mM Borat mit Ouabain (▲) und PTX (●,○) inkubiert und deren Hemmwirkung auf die ATPase gemessen. Die Inkubationsbedingungen sind unter 3.6.3. beschrieben.

Wird Borat aus dem Inkubationsansatz entfernt, so wird die Hemmkurve von PTX abgeflacht und nach rechts verschoben. Die Hemmwirkung von Ouabain wird dagegen nicht durch Borat beeinflußt (nicht gezeigt).
Zu unseren Ergebnissen (Böttinger und Habermann, 1984) paßt, daß ATPasenpäparationen aus Herz und Gehirn ebenfalls durch PTX in diesem Konzentrationsbereich gehemmt werden (Ishida et al., 1983).

4.5. RUBIDIUMEFFLUX AUS VESIKELN

Die Bindungsstelle der Cardenolide an der Na^+,K^+-ATPase liegt auf der äußeren Seite der Zellmembran (Jorgensen, 1983) Man darf daher annehmen, daß auch PTX von der Außenseite der Membran wirkt. Falls diese Annahme zutrifft, sollte PTX unwirksam sein, wenn es auf die Innenseite der Membran gebracht wird. Daher wurde untersucht ob bzw. wie

PTX im Vergleich zu anderen Substanzen auf inside-out Vesikel aus menschlichen Erythrozyten wirkt. Der Efflux von $^{86}Rb^{+}$ dient als Indikator für die Erhöhung der Permeabilität der Membran.

4.5.1. Zeitabhängiger Efflux von ^{86}Rubidium

Vesikelpräparationen, wie die von uns verwendeten, wurden von Lew et al. (1982) zur Untersuchung des Ca^{2+}-abhängigen K^{+}-Kanals eingesetzt. Bei einer Endkonzentration von 0.1 mM wird durch Calcium ein deutlicher $^{86}Rb^{+}$-Efflux erzielt (Abbildung 30). Nach etwa 20 Minuten ist der Ca^{2+}-bedingte Efflux beendet, die Rubidiumkonzentration nimmt in beiden Vesikelpopulationen (mit und ohne Calcium) in gleichem Maße ab.

PTX fördert unter diesen Bedingungen den Efflux aus den Vesikeln nicht. Auch bei Abwesenheit von Calcium erfolgt keine signifikante Zunahme des Effluxes (nicht dargestellt). Das Kaliumionophor Valinomycin führt bei einer Endkonzentration von 0.1 µM zu einem prompten, beinahe vollständigen Rubidiumefflux aus den Vesikeln.

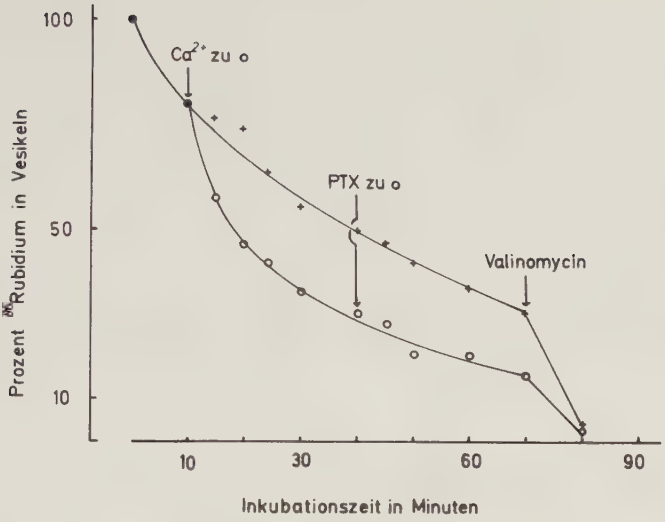

Abb. 30 Zeitabhängiger ^{86}Rubidiumefflux aus IOV. Seine Förderung durch Ca^{2+} oder Valinomycin, Unwirksamkeit von PTX.

10 Minuten nach Beginn der Inkubation bei 37°C wird Ca^{2+} (Endkonzentration 0.1 mM) und nach 40 Minuten PTX (Endkonzentration 0.1 µM) zu den gleichen, mit (○) gekennzeichneten Ansätzen, zugegeben. Abschließende Zugabe von Valinomycin läßt in beiden Fällen ^{86}Rubidium schnell austreten. Der Versuch wurde mittels Ionenaustauschersäulen durchgeführt (s. 3.7.).

4.5.2. Einfluß verschiedener Substanzen auf den Efflux

Die von Lew et al. (1982) beschriebenen Substanzen (Calcium, ATP und das Calciumionophor A 23 187) fördern in den aus der Literatur bekannten Konzentrationen den Rubidiumefflux (Abbildung 31). Er ist aber nur partiell im Vergleich zum Effekt des Valinomycins.

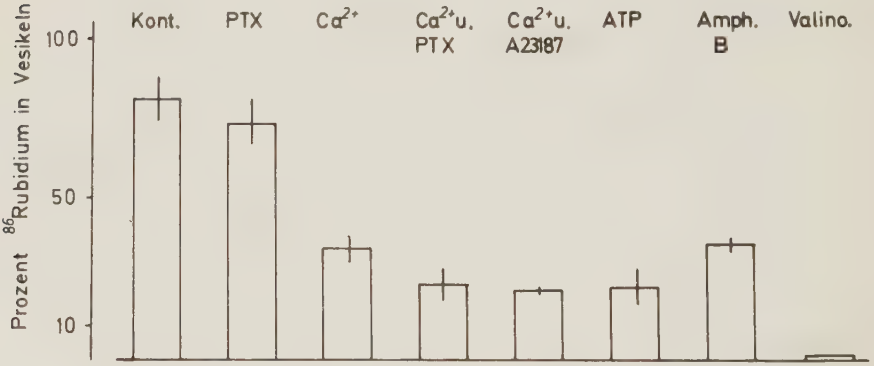

Abb. 31 Rubidiumefflux aus inside-out Vesikeln bedingt durch verschiedene Substanzen.
Nach einer Inkubation von 45 Minuten mit den entsprechenden Substanzen wird der Rubidiumgehalt in den Vesikeln mittels Filtration bestimmt. Endkonzentrationen der verwendeten Substanzen : ATP 1.5 mM, Calcium und A 23 187 jeweils 0.1 mM, Amphotericin B 10 µM, Valinomycin 1 µM uund PTX 0.1 µM. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus je vier Bestimmungen dargestellt. Der Rubidiumgehalt zu Beginn der Inkubation wurde als 100 % gesetzt.

Das Vorhandensein von rightside-out Vesikeln ergibt sich aus der Steigerung des Ca^{2+}-bedingten Effluxes durch das Ionophor A 23 187 (Lew et al., 1982). Durch Gabe des Ionophors wird dieser Raum für Calcium erreichbar und es erfolgt ein zusätzlicher Efflux, über den Ca^{2+}-bedingten hinaus.
Unter diesen Kriterien liegen in unseren Vesikeln zwischen 10 und 15 % ROV vor. Auch PTX steigert den Rubidiumefflux in Gegenwart von Calcium um ca. 12 %, was zu dieser Zahl paßt.

4.5.3. Einfluß von Kalium auf den PTX-bedingten Rubidiumefflux aus ROV

Während die ROV bei der Messung des Brutto-Effluxes von $^{86}Rb^{+}$ eher störten, konnte ihr eigenes Verhalten isoliert studiert werden, wenn man mittels Calcium die IOV weitgehend entleert. Es bleibt theoretisch dann ca. 50 % des Rubidiums freisetzbar durch PTX. Die Nachweis-Grenze liegt um 10^{-8} M PTX, wohl wegen des Fehlens von ATP. Wie der Kaliumaustritt aus Erythrozyten in früheren Versuchen durch externes Rubidium hemmbar war (Ahnert-Hilger et al., 1982), so wird der Rubidiumefflux aus diesen ROV durch externes Kalium abgeschwächt (1 mM) oder blockiert (60 mM). Die Daten sind in der Tabelle 9 zusammengestellt.

Tab. 9 Einfluß von Kalium auf den PTX-bedingten ^{86}Rubidiumefflux.

Die Summe der Konzentrationen von Kalium und Natrium beträgt bei allen Ansätzen 60 mM. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert aus vier Bestimmungen dar. PTX und Calcium wurden gleichzeitig zugesetzt und dann 45 Minuten bei 37°C inkubiert.

µM PTX	% $^{86}Rb^+$ in Vesikeln nach Kaliumeinwirkung			
	0 mM K^+	1 mM K^+	10 mM K^+	60 mM K^+
0	53,6	54,1	52,6	55,4
1,0	42,7	44,3	45,0	51,8
0,1	41,9	45,6	52,2	55,0
0,01	52,0	53,2	51,5	53,6

Die Steigerung des Effluxes gegenüber der Kontrolle beträgt aber nur etwa 10 %, was dem Gehalt an ROV entsprechen dürfte.

5. DISKUSSION

5.1. IODIERUNG VON PALYTOXIN

Proteine und Peptide lassen sich in der Regel über Tyrosyl- und Histdylreste iodieren. In biologischen Systemen ist der Einbau von Halogeniden (Chlor, Brom, Iod) in Proteine (Morrison und Schönbaum, 1976) ,sowie der Iodeinbau in Lipide (Boeynaems und Hubbard, 1980) durch Peroxidasen beschrieben. So wird die Arachidonsäure über ihre 4 Doppelbindungen in Anwesenheit von Peroxidase/H_2O_2/Iodid in eine Reihe iodierter Produkte überführt (Boeynaems und Hubbard, 1980; Boeynaems et al., 1981). PTX enthält weder Histidin noch Tyrosin, wohl aber 8 Doppelbindungen als potentielle Angriffspunkte für eine radioaktive Markierung mit ^{125}Iod.
In der vorliegenden Arbeit wird erstmals die kovalente Anlagerung von ^{125}Iod an PTX demonstriert. Ziel war die Gewinnung nanomolarer Mengen an iodiertem Material. Dabei mußte trägerfrei gearbeitet werden , da PTX in picomolaren Mengen seine Wirkungen am Erythrozyten zeigt. Die Verwendung anderer Isotope schied aus, weil nur ^{125}Iod den Einbau einer ausreichend hohen spezifischen Radioaktivität gestattet. Es wurde ein Überschuß an Iod eingesetzt, um eine möglichst hohe Einbaurate von ^{125}Iod zu erzielen.
Nach der Reaktion mit ^{125}Iod werden 17 % der eingesetzten Radioaktivität im PTX-Peak der Gelfiltration (Fraktion I) gefunden. Die Umsetzung mindert die biologische Aktivität (bestimmt vor der Gelfiltration) auf 21 % gegenüber dem

eingesetzten Material. Das Iodierungsprodukt ist in der Dünnschicht-Chromatographie nach diesem Reinigungsschritt nicht einheitlich. Alle Versuche, mit den geläufigen chromatographischen Methoden eine Abtrennung von nicht bindungsfähigen Iodierungsprodukten zu erzielen, blieben ohne Erfolg. Auch eine Unterscheidung von markiertem und unmarkiertem PTX gelang nicht. So blieb nur die Anwendung eines Affinitätsverfahrens, welches dann natürlich eine Trennung von markiertem und unmarkiertem PTX ausschloß. Durch Bindung an Nierenmembranen erhielten wir ein in der DC homogenes Produkt, das biologische Aktivität zeigt, spezifisch an Erythrozyten bindet, und dessen Bindungsverhalten charakteristische Bedingungen der Wirkung des nativen Toxins widerspiegelt.

Nierenmembranen wurden gewählt, weil sie ATPase-reich sind (Jorgensen, 1982) und PTX mit der Na^+,K^+-ATPase reagiert. Durch dieses Reinigungsverfahren wird die spezifische (mit 3 x 10^{-8} M PTX verdrängbare) Bindung an intakte Erythrozyten ungefähr verzehnfacht. Bei der analogen Reinigung von ^{125}I-Parathormon erreichten Nissenson und Arnaud (1978) eine Steigerung der spezifisch bindbaren Radioaktivität um den Faktor 8.

Die Ausbeute beim Affinitätsverfahren ist unbekannt. Daher war es erforderlich die Konzentration des Gemisches aus markiertem und unmarkiertem Wirkstoff auf andere Weise zu ermitteln. Dazu boten sich zwei Verfahren an. Bei der bereits z.B. für Angiotensin I und das Follikel-stimulie-

rende Hormon beschriebenen Methodik des "self-displacement" (Roulston, 1979; Dias und Reichert, 1982) wird von der Hypothese ausgegangen, daß die Affinitäten des Tracers und des nativen Toxins zur Bindungsstelle am Erythrozyten gleich sind. Unter dieser Voraussetzung ermittelten wir den Gehalt an PTX und berechneten hieraus eine spezifische Radioaktivität von 560 ± 186 Ci/mmol. Hieraus folgt, daß höchstens jedes vierte Molekül ein Iodatom enthält; denn bei einer äquivalenten Iodierung wäre eine spezifische Radioaktivität von 2 000 Ci/mmol zu erwarten gewesen. Es liegt also iodiertes PTX neben einem Überschuß an nativem Toxin in unserer Präparation vor.

Alle Doppelbindungen sind bei der Arachidonsäure potentiell iodierbar. Eine Mehrfachiodierung ist möglich und erfolgt ohne Stereoselektivität (Turk et al., 1983). Dies ist auch bei PTX zu erwarten, da 1.) nur ein ganz geringer Anteil der Radioaktivität an Membranen bzw. Zellen bindet und 2.) mehrere Iodierungsprodukte auftreten. Bei der Umsetzung von PTX mit Iod ist zu bedenken, daß die Stereochemie des Moleküls (7 stereogene Doppelbindungen) verändert wird. Eine solche Veränderung in der Stereochemie könnte den möglichen Verlust an biologischer Aktivität und Bindungsvermögen erklären.

Auch ist zu bedenken, daß wir über die Einheitlichkeit des zu iodierenden PTX-Präparates nur unzureichend Bescheid wissen. Wenn es biologisch inaktive oder wenig aktive Beimischungen, etwa in Form von Isomeren enthält (Uemura et

al., 1985), sollten diese gleichfalls iodiert werden. Sie würden dann eine nur partielle Bindungsfähigkeit derjenigen PTX-Fraktion vortäuschen, welche den biologisch aktiven und bindungsfähigen Anteil darstellt.

Unter spezifischer Bindung eines markierten Liganden wird i.a. derjenige Anteil verstanden, welcher durch einen Überschuß an unmarkiertem Liganden verdrängt wird. Es muß betont werden, daß ^{125}I-PTX weitaus am besten diese spezifische Verdrängung aufweist, wenn man an intakten Zellen, z.B. Erythrozyten, arbeitet. Sobald man die intakte Zellstruktur zerstört, steigt die unspezifische Bindung massiv an, und die spezifische Bindung verschwindet. Selbst an ATPase-reichen subzellulären Präparationen von Nierenmembranen liegt die unspezifische Bindung bei 50 %, wohl weil nicht alle Membranen sich zu rightside-out Vesikeln verschließen. Möglicherweise beruht die an alle subzellulären Präparaten überaus störende unspezifische Bindung auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Position 20 - 40 des PTX-Moleküls und Membranlipiden. Da aber Liposomen gegen PTX resistent sind (Chhatwal, unveröffentlichte Ergebnisse; Ozaki et al., 1984c; Lauffer et al., 1985) spricht nichts für eine funktionelle Bedeutung der unspezifischen Bindung.

5.2. BIOLOGISCHE AKTIVITÄT DER PALYTOXINDERIVATE

PTX enthält neben den Doppelbindungen eine freie Aminogruppe und 42 Hydroxylgruppen, die für eine Derivatisierung zur Verfügung stehen. Frühere Untersuchungen von Hirata et al. (1979) bzw. Kudo und Shibata (1980) über Struktur/Aktivitätsbeziehungen zeigten, daß eine Acetylierung von PTX zum weitgehenden Verlust biologischer Aktivität führt. Acetylierung mit Acetanhydrid ergab ein biologisch inaktives Derivat. Die Rest-Aktivität des N-Acetyl-PTX betrug nur noch 1 % des nativen Toxins an Spinalnerven des Frosches bzw. dem Vas deferens des Meerschweinchens. Die in dieser Arbeit dargestellten Derivate zeigen ebenfalls eine Abnahme der biologischen Aktivität. Der PTX-bedingte Kaliumaustritt aus Erythrozyten liefert, bezogen auf das native Molekül, für N-Acetyl-PTX noch 12 % und für Dansyl-PTX 0.1 % Restaktivität. Der Verlust an biologischer Aktivität beider Derivate zeigt die Bedeutung der freien Aminogruppe für die Wirksamkeit des Toxins.

Auch bei der Iodierung von PTX entspricht die biologische Aktivität nicht mehr der des Ausgangsproduktes. Mißt man die Kaliumfreisetzung durch ^{125}I-PTX im Vergleich zu nativem PTX, so errechnet sich eine spezifische Radioaktivität von 530 Ci/mmol. Das entspricht etwa dem im "self-displacement" bestimmten Wert (465 Ci/mmol).

Das bedeutet, daß biologische Aktivität und Bindungsvermögen sich entsprechen, und die nicht-bindenden Kontaminationen in

beiden Tests keine Rolle spielen. Wenn allerdings Bindung und Wirksamkeit in gleichem Maße herabgesetzt sind, wird dies bei der angewandten Methode nicht erkennbar sein.

5.3. BINDUNGSVERHALTEN AM ERYTHROZYTEN

Für die Spezifität einer Ligand/Rezeptor Wechselwirkung gelten mehrere Kriterien. An einer limitierten Anzahl von Bindungsstellen muß die Bindung durch Sättigbarkeit, hohe Affinität und Reversibilität charakterisiert sein (Cuatrecasas et al., 1975). Vor allem soll die Rezeptorbesetzung relevante biologische Veränderungen auf zellulärer bzw. subzellulärer Ebene auslösen.

Wendet man diese Kriterien auf die PTX-Bindung an, so stellt nach unseren Untersuchungen am Erythrozyten die PTX-Bindung ein typisches Beispiel für eine Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor dar.

1. Die Bindung von ^{125}I-PTX an Erythrozyten zeigt Sättigungscharakter.
2. Die ermittelte Assoziationskonstante von 2.5×10^{10} M^{-1} weist die Bindung des Toxins an den Erythrozyten als hochaffin aus. Die Affinität liegt also höher als die des Insulins (Koch und Weber, 1981) bzw. IgEs (Conrad et al., 1978), deren Assoziationskonstanten jeweils bei 10^9 M^{-1}

liegen.

3. Die Dissoziationsexperimente zeigen, daß gebundenes ^{125}I-PTX durch Verdünnung bzw. Behandlung mit überschüssigem nativem Toxin von seiner Bindungsstelle entfernbar ist. Die Bindung von ^{125}I-PTX hat also reversiblen Charakter.

4. Jeder hemmende oder fördernde Einfluß auf die Bindung von ^{125}I-PTX beeinflußt in gleicher Weise die Wirkung.

a.) So fördert Borat die PTX-Wirkung in allen bisher untersuchten Systemen (Habermann et al., 1982; Chhatwal et al., 1982; Böttinger und Habermann, 1984). Das gleiche gilt auch für die Bindung an Erythrozyten.

b.) Calcium fördert die Wirkung von PTX an Mastzellen (Chhatwal et al, 1982), isolierten Herzventrikeln (Rayner at al., 1975), Erythrozyten (Ahnert-Hilger et al., 1982) und Phäochromocytoma Zellen (Tatsumi et al., 1984). Dementsprechend fördert Calcium auch die Bindung von ^{125}I-PTX. Ersetzt man Calcium durch andere zweiwertige Kationen, findet man nur bei Strontium und Barium eine Förderung der Bindung an menschliche Erythrozyten. Barium und Strontium begünstigen übrigens auch den Kaliumaustritt aus Kaninchen-Erythrozyten (Nagase et al., 1984).

c.) Kaliumionen hemmen sowohl die Wirkung von PTX (Ahnert-Hilger et al., 1982), als auch die Bindung von ^{125}I-PTX.

d.) Am überzeugendsten ist die enge Beziehung zwischen Bindung und Wirkung von PTX, die sich aus den Rezeptoreigenschaften der Na^+,K^+-ATPase ergibt. Darauf wird in Kapitel 5.4. näher eingegangen.

5.4. PALYTOXIN UND OUABAIN IM VERGLEICH

Die Förderung des Kaliumaustritts aus Erythrozyten durch PTX wird durch Cardenolide gehemmt. Dieser von Habermann und Chhatwal (1982) erhobene Befund wurde von Ozaki et al. (1984) bestätigt. Wie wir jetzt gezeigt haben hemmen Cardenolide auch die ^{125}I-PTX Bindung an Erythrozyten, wobei allerdings im Vergleich zu nativem Toxin sehr viel höhere Konzentrationen an Cardenoliden nötig sind. Deren Aglykone hemmen sowohl die Bindung von ^{125}I-PTX als auch die Wirkung von PTX deutlich schwächer als die entsprechenden Glykoside. Digitoxigenin ist wirksamer als Ouabagenin, möglicherweise wegen seiner besseren Lipid-löslichkeit. Eine quantitative Beziehung zwischen der Hemmung einer ATPase aus Rinderhirn und Hemmung der PTX-Wirkung am Erythrozyten besteht nicht (Ozaki et al., 1984); denn die ATPasenhemmung fällt für PTX, die Glykoside und deren Aglykone in denselben Bereich um 10^{-7} bis 10^{-6} M. Der Zuckeranteil der Cardenolide fördert also deren inhibitorische Wirkung auf den erythrozytären PTX-Effekt. Allerdings wurde der Effekt von PTX auf die Na^+,K^+-ATPase des intakten Erythrozyten bisher nicht gemessen, und dürfte wohl mit den derzeit verfügbaren Methoden nicht meßbar sein.

Umgekehrt wird ^{3}H-Ouabain von seiner hochspezifischen Bindung (Akera, 1977) an die membranständige Na^+,K^+-ATPase durch PTX verdrängt (Habermann und Chhatwal, 1982). Unsere Bindungsexperimente an intakten Erythrozyten mit ^{3}H-Ouabain

zeigen, daß PTX ein äußerst wirksamer Inhibitor der Ouabain-Bindung ist. Tabelle 10 faßt die diskutierten Charakteristika der Bindung und Wirkung von PTX im Vergleich zur Bindung von Ouabain an Erythrozyten zusammen.

Tab. 10 Tabellarische Übersicht von Substanzen, die die Bindung und Wirkung von PTX bzw. Ouabain beeinflussen. Förderung +, Hemmung - und kein Effekt 0.

	Bindung von radioaktivem		Wirkung von
	PTX	Ouabain	PTX
Borat	+	0	+
Cálcium	+	0	+
Kalium	-	-	-
Mg^{2+},P_i	0	+	0
Ouabain	-	-	-
PTX	-	-	
ATP-Verarmung	-	-	-

Die Hemmung der PTX-Effekte ist nicht auf den Erythrozyten beschränkt; denn Ouabain mindert auch am Vas deferens und an glatter Muskulatur die PTX Wirkungen (Ishida et al., 1985 a und b; Ito et al., 1985). Hemmkonstanten und Dissoziationskonstanten sind nahezu identisch, d.h. die Affinität

jeder Substanz zum eigenen Rezeptor, wie zum Rezeptor der anderen ist gleich (Tabelle 11). Hieraus läßt sich der Schluß ziehen, daß am Erythrozyten beide Substanzen denselben Rezeptor, die Na^+,K^+-ATPase, besetzen.

Tab.11 Gegenüberstellung von K_D- und K_i-Werten von PTX und Ouabain aus den Bindungsexperimenten. Die Werte sind in M angegeben.

	Bindung von	
Inhibitor	^{125}J-PTX	^{3}H-Ouabain
PTX	4×10^{-11}	8×10^{-11}
Ouabain	3×10^{-9}	3×10^{-9}

5.5. DIE Na^+, K^+-ATPASE ALS REZEPTOR FÜR PALYTOXIN

Herzglykoside entfalten ihre Wirkung durch Bindung an die Na^+,K^+-ATPase von der Membranaußenseite (Übersicht bei Bodemann, 1981). Inside-out Vesikel zeigen, obwohl eine unspezifische Bindung meßbar ist , unter PTX-Einfluß keinen Rubidiumefflux. Der eigentliche Angriffspunkt von PTX dürfte daher ebenfalls, wie derjenige der Herzglykoside, auf der Außenseite der Zellmembran lokalisiert sein. Hierfür sprechen auch die in 4.5.3. dargestellten Ergebnisse mit rigtside-out Vesikeln. Nur diese Vesikel zeigen einen Rubidiumefflux. Die hemmende Wirkung von Ouabain auf den PTX-bedingten Kaliumaustritt sowie die Kompetition von PTX mit ^{3}H-Ouabain an Erythrozytenmembranen (Habermann und Chhatwal, 1982) deutete bereits auf eine Beteiligung der Na^+,K^+-ATPase hin. Der Hundeerythrozyt, der praktisch keine Na^+,K^+-ATPase Moleküle in der Membran besitzt (Maede und Inaba, 1985), bindet weder ^{3}H-Ouabain noch ^{125}I-PTX.

Der direkte Nachweis der Enzymhemmung durch PTX an vier verschiedenen Membranpräparationen (Ishida et al., 1983; Böttinger und Habermann, 1984) bestätigte einen Einfluß auf das Enzym. Allerdings fällt auf, daß der IC_{50}-Wert für die Hemmung des Enzyms etwa 100 000fach höher liegt als der EC_{50}-Wert für den PTX-bedingten Kaliumaustritt am Erythrozyten.

Kompetitionsexperimente von PTX mit ^{3}H-Ouabain an durch Hämolyse gewonnene Erythrozytenmembranen (Habermann und

Chhatwal, 1982) und mit ^{125}I-PTX an Nierenmembranen (s. 4.3.2.) ergeben IC_{50}-Werte zwischen 10^{-8} und 10^{-7} M, die dann in dem für die Enzymhemmung dargestellten Bereich liegen. Das zeigt, daß PTX nur an intakte Erythrozyten mit einer Dissoziationskonstanten von etwa 10^{-11} M bindet.
Auch die ATP-Verarmung von Erythrozyten führt zu einer Minderung der Bindung von ^{125}I-PTX und ^{3}H-Ouabain. Die spezifische Bindung beider Tracer an die Membranen aus menschlichen Erythrozyten wird durch ATP, ADP und GTP ermöglicht. Dazu paßt, daß auch die Wirkung von PTX ATP-abhängig ist, wie frühere Untersuchungen in diesem Labor in zwei Ansätzen zeigten. Führt man ATP in Erythrozytenschatten ein und verschließt sie wieder, so wird ihr Ansprechen auf PTX, gemessen am Kaliumaustritt, massiv verbessert (Chhatwal et al., 1983). Umgekehrt mindert ATP-Depletion intakter Erythrozyten deren PTX-Empfindlichkeit (Habermann und Chhatwal, 1982). Man kann also davon ausgehen, daß die hochaffine Bindung und Wirkung von PTX nur an intakten Zellen ermittelt werden kann, welche eine dazu hinreichende ATP-Konzentration aufweisen.

Das in Abbildung 32 wiedergegebene Schema für den Mechanismus der Na^+,K^+-ATPase (Sen et al.,1969; Hart und Titus, 1973) besagt, daß die E_2-P - Form des Enzyms die Bindungsstelle für Ouabain darstellt (Glynn und Karlish, 1975; Robinson und Flashner, 1979). Der Übergang des Enzyms in diese Konfiguration wird auf 2 Wegen begünstigt :

1. Zusatz von ATP, Natrium und Magnesium. Dies ist in der mittleren Zeile des Schemas dargestellt.
2. Zusatz von Magnesium und Phosphat (untere Zeile des Schemas).

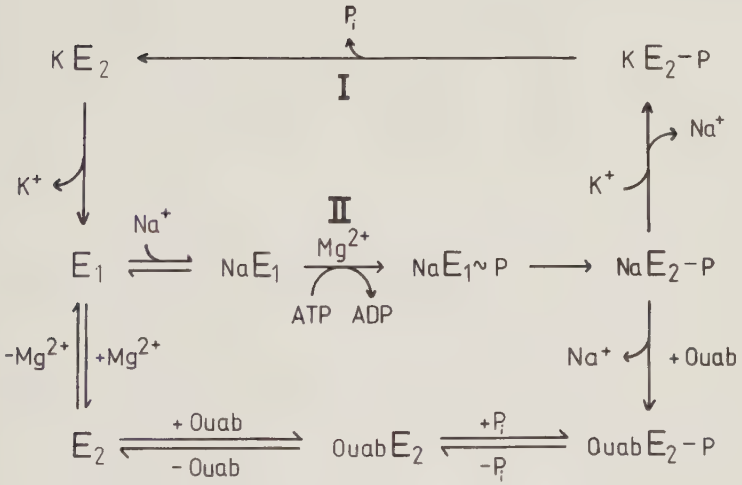

Abb. 32 Schema für die Beziehungen der einzelnen Konformationen der Na^+,K^+-ATPase (Sen et al., 1969; Hart und Titus, 1973). I bedeutet Na^+-abhängige Phosphorylaseaktivität und II die K^+-Phosphatase.

Auf beiden Wegen wird die Ouabain-Bindung an Membranpräpara-

tionen gefördert. Ouabain bindet nach Hart und Titus (1973) sowohl an die E_2-Konformation, wie an die E_2-P - Form der Na^+,K^+-ATPase, wobei beide Konformationen in einem Gleichgewicht stehen. Die Na E_1-P - Form bindet Ouabain nicht (Tobin et al., 1973). PTX dagegen bindet in Anwesenheit von Natrium und ATP, während der Zusatz von Mg^{2+} und P_i nicht fördert. Daher kommt als Enzymkonformation die Natrium-Form des Enzyms in Frage. Die K-E_2-P - Form scheidet als Bindungsstelle für PTX (wie auch für Ouabain) aus, weil Kalium die Bindung beider Liganden hemmt. Ob PTX außerdem sich auch die Na-freie E_2-P - Form mit Ouabain teilt, ist derzeit nicht zu entscheiden. Wenn PTX (nicht dagegen Ouabain) sich an die im mittleren Schenkel des Schemas, also im Hauptschluß liegende Na-E_2-P - Form bindet, könnte dies seine besonders starke Wirksamkeit verständlich machen.

GTP, ADP, AMP-PCP und ATP-γ-S binden wie ATP an die Nukleotidbindungsstelle der ATPase (Hansen et al., 1971; Tobin et al., 1974; Akera, 1981). Nur GTP kann ATP bei der Phosphorylierung ersetzen. ADP kann in ATP und AMP durch die Adenylatkinase umgewandelt werden. Eine spezifische Bindung von ^{125}I-PTX an Erythrozytenmembranen, sowie von ^{3}H-Ouabain (Schuurmans Stekhoven und Bonting, 1981) ist nur in Gegenwart der phosphorylierenden Nukleotide, nicht dagegen der Derivate möglich. Auch dies spricht dafür, daß die phosphorylierte Natrium-Form die bindende Konformation von PTX darstellt. Da Mg^{2+} und P_i nicht fördern, kann die PTX-Bindung nicht auf E_2-P beschränkt sein (unterer Teil des Schemas).

Aus den Bindungsdaten für ^{125}I-PTX ergeben sich 101 ± 24 Bindungsstellen pro Erythrozyt. Für Ouabain fanden wir 258 Bindungsstellen (Literatur 200 bis 1 200 Bindungsstellen; Erdmann, 1981). Das Verhältnis der Bindungsstellen beträgt also etwa 1 : 2. In der Membran liegt die Na^+,K^+-ATPase als Dimer vor (Anner, 1985). Ouabain bindet an die monomere Form (Jorgensen, 1982). Aufgrund des Molekulargewichts von PTX (etwa viermal größer als Ouabain) könnte PTX an das Dimere binden und so seine Wirkung entfalten. Zum Beleg wären aber direkte diesbezügliche Studien erforderlich.
Aus den übereinstimmenden Ergebnissen für Bindung und Wirkung an Erythrozyten läßt sich folgende Hypothese ableiten :

PTX bindet rasch an den Erythrozyten, dazu ist die Na^+,K^+-ATPase sowie ATP auf der Zellinnenseite notwendig. PTX verändert die Konformation der ATPase dergestalt, daß ein gerichteter ionaler Transport nicht mehr möglich ist. Die Pumpe oder deren nächste Umgebung wird zu einer unselektiven Pore für kleine Ionen.

Die Bindung von PTX ist die Voraussetzung für die Wirkung am Erythrozyten. Da Ouabain die Bindung des Toxins verhindern kann, ist es auch ein Hemmstoff bezüglich der PTX Wirkung. Während PTX das Enzym oder seine unmittelbare Umgebung in eine Pore umwandelt, fixiert Ouabain die Pumpe in einer Konformation, in der kein Ionenfluß möglich ist. Die Frage

ob picomolare Konzentrationen von PTX an intakten Zellen das Enzym hemmen, und ob eine solche Enzymhemmung für die Wirkung notwendig ist, muß vorläufig offen bleiben. Insofern bestätigen und erweitern unsere Befunde zur Bindung das von Habermann anhand von Wirkungsdaten aufgestellte Schema (Abbildung 33).

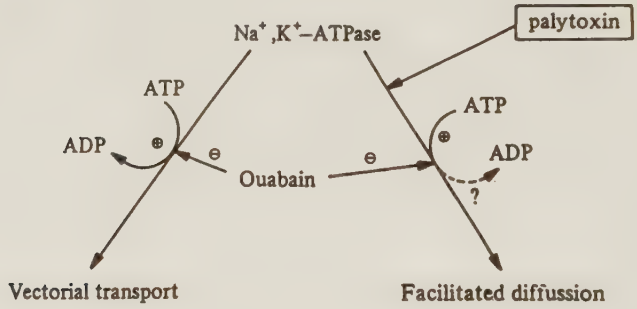

Abb. 33 Schema für die Wirkung von PTX am Erythrozyten (nach Chhatwal et al., 1983).
Förderung + , Hemmung - , ? unbekannt ob erforderlich

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das basische Polyketid Palytoxin aus PALYTHOA caribaeorum (Molekulargewicht 2 680) ist das wirksamste der tierischen Gifte. Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Analyse seines Wirkungsmechanismuses, insbesondere hinsichtlich seiner Wechselwirkungen mit der Na^+,K^+-ATPase.

Hierzu wurde erstmals Palytoxin radioaktiv markiert und verwendet. PTX reagiert mit elementaren ^{125}Iod nach Hunter und Greenwood (1962), welches sich wahrscheinlich an die Doppelbindungen lagert. Das Reaktionsprodukt wird durch Gelfiltration an Sephadex G 10 und Affinitäts-Reinigung an Nierenmembranen von Kontaminationen befreit. Das Produkt besteht aus einem Gemisch von markiertem und unmarkiertem PTX. Gleichwohl erscheint es dünnschicht-chromatographisch einheitlich. Seine spezifische Aktivität beträgt 560 $\pm$ 184 Ci/mmol.

^{125}I-PTX bindet spezifisch an intakte Erythrozyten. Die Dissoziationskonstante beträgt 3.97×10^{-11} M bei 101 $\pm$ 24 Bindungsstellen je Erythrozyt. Die Bindung ist schnell und reversibel. Sie verläuft mit der Wirkung (gemessen am K^+-Austritt) parallel; jedoch besteht ein Rezeptor-Überschuß. Zweiwertige Kationen (Ca $>$ Sr $>$ Ba) fördern sowohl den PTX-bedingten Kaliumaustritt, wie auch die spezifische Bindung von ^{125}I-PTX am Erythrozyten. Borat führt, möglicherweise durch eine Veränderung der Raumstruktur über die Hydroxylgruppen des Moleküls, zu einer höheren Affinität von PTX zu seinem Rezeptor und damit auch zu einer Verstär-

kung seiner Wirkung. Kalium hemmt die Bindung wie die Wirkung von PTX. Derivate von PTX mit einem blockierten N-Terminus haben die Affinität zum Rezeptor weitgehend eingebüßt, wie Verdrängungsexperimente gegen ^{125}I-PTX zeigten. Im gleichen Ausmaß sinkt die Fähigkeit den Kaliumaustritt am Erythrozyten zu fördern.

Ouabain verhindert nicht nur den PTX-bedingten Kaliumaustritt sondern tritt auch in Wettstreit mit ^{125}I-PTX um dessen Bindungsstelle am Erythrozyten. Umgekehrt kompetiert PTX mit ^{3}H-Ouabain. K_D für ^{125}I-PTX und K_i von PTX für ^{3}H-Ouabain sind überaus niedrig. Sie sind für beide markierten Liganden nahezu identisch (ca.10^{-11} M), ebenso wie die von Ouabain (ca 10^{-9} M).Das Aglykon Ouabagenin ist schwächer wirksam als Ouabain, sowohl bei der Verdrängung von ^{125}I-PTX und ^{3}H-Ouabain als auch hinsichtlich der Verhütung der K^+-Freisetzung.

Hundeerythrozyten enthalten kaum Na^+,K^+-ATPase Moleküle und binden daher auch kein PTX.

Die Bindung sowohl von ^{125}I-PTX als auch von ^{3}H-Ouabain ist vom Zustand der ATPase abhängig, denn

a) ein ATP-Verlust von Erythrozyten geht mit einer verminderten Bindungsfähigkeit für ^{125}I-PTX und auch ^{3}H-Ouabain einher.

b) Membranen von Erythrozyten binden ^{125}I-PTX spezifisch nur in Anwesenheit von ATP, ADP oder GTP.

Im Gegensatz zu der Bindung von Palytoxin wird die Bindung von ^{3}H-Ouabain an Erythrozytenmembranen auch durch Magnesium

und Phosphat gefördert.

Die Bindungsversuche zeigen, daß der Rezeptor für Palytoxin auf der Außenseite der Erythrozytenmembran sitzt. Dazu paßt die sehr geringe Palytoxin-Empfindlichkeit von inside-out Vesikeln.

PTX und Ouabain hemmen die Na^+,K^+-ATPase. Die IC_{50}-Werte für beide Substanzen liegen zwischen 10^{-7} und 10^{-6} M.

Nach den vorgelegten Versuchen ist die Na^+,K^+,ATPase am Erythrozyten, wahrscheinlich deren phosphorylierte Na-Form, Rezeptor für Palytoxin. Alle Daten stehen im Einklang mit zwei Hypothesen:

1. Die Permeabilitätserhöhung des Erythrozyten kommt durch eine Erhöhung der Ionenpermeabilität dieses Enzyms oder seiner unmittelbaren Umgebung zustande.

2. Alle bekannten Aktivatoren bzw. Hemmer der Wirkung von PTX bewirken dies durch eine Modulation seiner Bindung.

7. LITERATUR

Ahnert-Hilger, G.; Chhatwal, G.S.; Hessler, H.-J., Habermann E. (1982)
Biochim. Biophys. Acta 688, 486 - 494

Akera, T. (1971)
Biochim. Biophys. Acta 249, 53 - 62

Akera, T. (1977)
Science 198, 569 - 574

Akera, T. (1981)
Handb. Exp. Pharmacol. 56/I, 287 - 336

Akera, T.; Larsen, F.S.; Brody, T.M. (1969)
J. Pharmacol. Exp. Ther. 170, 17 - 26

Anner, B.M. (1985)
Biochem. J. 227, 1 - 11

Attaway, D.H.; Ciereszko, L.S. (1974)
Proc. 2nd Int. Coral Reef Symposium Vol. I, Great Barrier Reef Committee, Brisbane, 497 - 504

Beress, L.; Zwick, J.; Kolkenbrock, H.J.; Kaul, P.N.; Wassermann, O.; (1983)
Toxicon 21, 285 - 290

Bodemann, H.H. (1981)
Klin. Wochenschr. 59, 1333 - 1343

Böttinger, H.; Habermann, E. (1984)
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.325,85 - 87

Boeynaems, J.-M.; Hubbard, W.C. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 9001 - 9004

Chan, P.C.; Calabrese, C.; Theil, L.S. (1964)
Biochim. Biophys. Acta 79, 424 - 426

Cheng, Y.-C.; Prusoff, W.H. (1973)
Biochem. Pharmacol. 22, 3099 - 3108

Chhatwal, G.S.; Ahnert-Hilger, G.; Beress, L.; Habermann, E. (1982)
Int. Arch. Allergy appl. Immunol. 68, 97 - 100

Chhatwal, G.S.; Hessler, H.-J.; Habermann, E. (1983)
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 323, 261 - 268

Conrad, D.H.; Bazin, H.; Sehon, A.H.; Froese, A. (1975)
J. Immunol. 114, 1688 - 1691

Cuatrecasas, P.; Hollenberg, M.D. (1975)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 62, 31 - 41

Dias, J.A.; Reichert, L.E. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 613 - 620

Dodge, J.T.; Mitchell, C.; Hanahan, D.J. (1963)
Arch. Biochem. Biophys. 100, 119 - 130

Eisner, D.A.; Richards, D.E. (1981)
J. Physiol. (London) 319, 403 - 418

Erdmann, E. (1981)
Handb. Exp. Pharmacol. 56/I, 337 - 380

Erdmann, E. (1982)
Red Cell Membranes a Methodological Approach, Academic Press, London, 251 - 262

Erdmann, E.; Schoner, W. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 330, 302 - 315

Erdmann, E.; Hasse, W. (1975)
J. Physiol. (London) 251, 671 - 682

Forbush III, B. (1983)
Analyt. Biochem. 128, 159 - 163

Garcia-Castineiras, S.; White, J.I.; Rodriguez, L.D.; Toro-Goyco, E. (1977a)
Biochem. Pharmacol. 26, 589 - 594

Garcia-Castineiras, S.; White, J.I.; Toro-Goyco, E. (1977b)
Molec. Pharmacol. 13, 181 - 184

Glynn, I.M.; Karlish, S.J.D. (1975)
Annual Rev. Physiol. 37, 13 - 55

Gray, W.R. (1972)
Meth. Enzymol. Vol. XXV, 121 - 138

Habermann, E. (1983)
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 323, 269 - 275

Habermann, E.; Fischer, K. (1979)
Eur. J. Biochem. 94, 355 - 364

Habermann, E.; Chhatwal,G.S. (1982)
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 319, 101 - 107

Habermann, E.; Ahnert-Hilger, G.; Chhatwal, G.S.; Beress, L. (1981a)
Biochim. Biophys. Acta 649, 481 - 486

Habermann, E.; Chhatwal, G.S.; Hessler, H.-J. (1981b)
Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 317, P374

Hansen, O.; Jensen, J.; Norby, J.G. (1971)
Nature New Biol. 234, 122 - 124

Hart, W.M.; Titus, E.O. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 4674 - 4681

Hirata, Y.; Uemura, D.; Ueda, K.; Takano, S. (1979)
Pure appl. Chem. 51, 1875 - 1883

Ishida, Y.; Ohizumi, Y.; Shibata, S. (1982)
Fed. Proc. 41, 1321

Ishida, Y.; Tagaki, K.; Takahashi, M.; Satake, N.; Shibata, S. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 7900 - 7902

Ishida, Y.; Kajiwara, A.; Takagi, K.; Ohizumi, Y.; Shibata, S. (1985a)
J. Pharmacol. Exp. Ther. 232, 551 - 556

Ishida, Y.; Satake, N.; Habou, J.; Kitano, H.; Shibata, S. (1985b)
J. Pharmacol. Exp. Ther. 232, 557 - 560

Ito, K.; Saruwatari, N.; Mitani,K.; Enomoto, Y. (1985)
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 330, 67 - 73

Jorgensen, P.L. (1974)
Meth. Enzymol. Vol. XXXII , 277 - 290

Jorgensen, P.L. (1982)
Biochim. Biophys. Acta 694, 27 - 68

Jorgensen, P.L. (1983)
Brush Border Membranes, CIBA Foundation Symposium 95, Pitman, 253 - 272

Kimura, S.; Hashimoto, Y. (1972)
Publ. Seto Mar. Biol. Lab. 20, 713 - 718

Kishi, Y. (1983)
Current Trends in Organic Synthesis, Proc. Int. Conf. 4th, Pergamon (Oxford), 115 - 130

Klebanoff, S.J. (1982)
Biochemistry 21, 4110 - 4116

Ko, S.S.; Finan, J.M.; Yonaga, M.; Kishi, Y.; Uemura, D.; Hirata, Y.; Leder, J.; Cha, J.K.; Christ, W.J.; Fujioka, H.; Klein, L.L.; McWorther, W.W.; Pfaff, K.P. (1982)
J. Am. Chem. Soc. 104, 7362 - 7371

Koch, R.; Weber, U. (1981)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 347 - 351

Kudo, Y.; Shibata, S. (1980)
Brit. J. Pharmacol. 71, 575 - 579

Lauffer, L.; Stengelin, S.; Beress, L.; Hucho, F. (1985)
Biochim. Biophys. Acta 818, 55 - 60

Lew, V.L.; Muallem, S.; Seymour, C.A. (1982)
Nature 296, 742 - 744

Macfarlane, R.D.; Uemura, D.; Ueda, K.; Hirata, Y. (1980)
J. Am. Chem. Soc. 102, 875 - 876

Maede, Y.; Inaba, M. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 3337 - 3343

Martin, W. (1982)
Dissertation, Universität Tübingen, Institut für Physiologische Chemie

Morrison, M.; Schönbaum, G.R. (1976)
Annual Rev. Biochem. 45, 861 - 888

Muramatsu,K.; Uemura,D.; Fujiwara, M.; Narahashi, T. (1984)
J. Pharmacol. Exp. Ther. 231, 488 - 494

Moore, R.E.; Bartolini, G. (1981)
J. Am. Chem. Soc. 103, 2491 - 2494

Moore, R.E.; Scheuer, P.J. (1971)
Science 172, 495 - 497

Moore, R.E.; Woolard, F.X.; Bartolini, G. (1980)
J. Am. Chem. Soc. 102, 7370 - 7372

Moore, R.E.; Bartolini, G.; Barchi, J.; Bothner-By, A.A.;
Dadok, J.; Ford, J. (1982)
J. Am. Chem. Soc. 104, 3776 - 3779

Nagase, H.; Ozaki, H.; Urakawa, N. (1984)
FEBS Letters 178, 44 - 46

Nissenson, R.A.; Arnaud, C.D. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 1469 - 1475

Ohizumi, Y.; Shibata, S. (1980)
J. Pharmacol. Exp. Ther. 214, 209 - 212

Ozaki, H.; Nagase, H.; Urakawa, N. (1984a)
FEBS Letters 173, 196 - 198

Ozaki, H.; Nagase, H.; Urakawa, N. (1984b)
J. Pharmacol. Exp. Ther. 231, 153 - 158

Ozaki, H.; Nagase, H.; Ito, K.; Urakawa, N. (1984c)
Japn. J. Pharmacol. 34, 57 - 66

Pichon, Y. (1982)
Toxicon 20, 41 - 47

Rayner, M.D.; Sanders, B.J.; Harris, S.M.; Lin, Y.C.; Morton, B.E. (1975)
Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 11, 55 - 64

Robinson, J.D.; Flashner, M.S. (1979)
Biochim. Biophys. Acta 549, 145 - 176

Rosenthal, H.E. (1967)
Analyt. Biochem. 20, 525 - 532

Roulston, J.E. (1979)
Annals Clin. Biochem. 16, 26 - 29

Scatchard, G. (1949)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660 - 672

Scheuer, P.J. (1964)
Fortsch. Chem. Org. Natstoffe 22, 265 - 278

Schuurmans-Stekhoven, F.; Bonting, S.L. (1981)
Physiol. Rev. 61, 1 - 76

Sen, A.K.; Tobin, T.; Post, R.L. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 6596 - 6604

Siegel, G.J.; Albers, R.W. (1967)
J. Biol. Chem. 242, 4972 - 4979

Tatsumi, M.; Takahashi, M.; Ohizumi, Y. (1984)
Molec. Pharmacol. 25, 379 - 383

Tobin, T.; Akera, T.; Baskin, S.I.; Brody, T.M. (1973)
Molec. Pharmacol. 9, 336 - 346

Tobin, T.; Akera, T.; Lee, C.Y.; Brody, T.M. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 345, 102 - 117

Turk, J.; Henderson, W.R.; Klebanoff, S.J.; Hubbard, W.C. (1983)
Biochim. Biophys. Acta 751, 189 - 200

Uemura, D.; Ueda, K.; Hirata, Y.; Katayama, C.; Tanaka, J. (1980)
Tetrahedron Lett. 21, 4857 - 4860

Uemura, D.; Ueda, K.; Hirata, Y.; Naoki, H.; Iwashita, T. (1981)
Tetrahedron Lett. 22, 2781 - 2784

Uemura, D.; Hirata. Y.; Iwashita, T.; Naoki, H. (1985)
Tetrahedron 41, 1007 - 1017

Wiles, J.S.; Vick, J.A.; Christensen, M.K. (1974)
Toxicon 12, 427 - 433

Williams, L.T.; Lefkowitz, R.J. (1978)
Receptor Binding Studies in Adrenergic Pharmacology , Raven Press, New York, 27 - 41

Lebenslauf

11. 3. 1955	geboren in Backnang (Baden-Württemberg) Eltern : Erwin Böttinger, Gipsermeister Luise Böttinger, geb. Schuh
1962 - 1966	Grundschule in Backnang
1966 - 1975	Max Born Gymnasium in Backnang
Mai 1975	Reifeprüfung
Jan. 1976 - März 1977	Grundwehrdienst bei der Bundeswehr
SS 1977 - WS 1982/83	Biochemie-Studium an der Eberhard Karls-Universität in Tübingen
Sept. 1979	Abschluß der Diplom-Vorprüfung
Feb. 1982	Diplom-Hauptprüfung
1. 3. 1982 - 5. 1. 1983	Anfertigung der Diplomarbeit "Untersuchungen zur speziesabhängigen Histaminfreisetzung durch MCD-Peptid" unter der Anleitung von PD Dr. Hartter am Physiologisch-Chemischen Institut in Tübingen
Seit 16. 1. 1983	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Rudolf Buchheim-Institut für Pharmakologie in Gießen
bis Nov. 1985	Anfertigung der vorliegenden Promotionsarbeit zum Thema "Die Na^+,K^+-ATPase des Erythrozyten als Rezeptor für Palytoxin : Studien mittels Radioligandenbindung und Enzymhemmung" unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. Habermann

Meine akademischen Lehrer waren folgende Herren Professoren:

Physiologische Chemie	:	K. Eisele, H. Guglielmi, P. Hartter, D. Mecke, H. Probst, U. Weber, G. Weitzel, A. Wendel, U. Weser
Organische Chemie	:	E. Bayer, M. Hanack, H. Hagenmaier, W. Voelter
Anorganische Chemie	:	M. Lindner, J. Strähle
Physikalische Chemie	:	H. Mauser, W. Zeil
Physikalische Biochemie	:	W. Voelter, K. Wegmann
Physik	:	H. Krüger, G. Staudt
Mathematik	:	G. Pommer
Mikrobiologie	:	V. Braun, H. Zähner
Botanik	:	H. Metzner
Zoologie	:	K.G. Grell, H. Günzl
Zoophysiologie	:	H.-U. Schnitzler
Anatomie u. Histologie	:	K. Reutter
Pharmakologie	:	H. Remmer
Med. Strahlenkunde	:	U. Feine, E. Kallee

difo druck
Laubanger 15
8600 Bamberg
Telefon 0951/64321